

Untersuchungen zur Methodik der indirekten Hämagglutination

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

LANE MEDICAL LIBRARY OF
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR
PALO ALTO, CALIFORNIA

vorgelegt von
Günther Kieninger
aus Ballmertshofen

1964

8031

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Tübingen

Direktor: Professor Dr. med. R. -E. Bader

Untersuchungen zur Methodik der indirekten Hämagglutination

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Günther Kieninger
aus Ballmertshofen

1964

Dekan: Professor Dr. med. H. Harms

1. Berichterstatter: Professor Dr. R. -E. Bader

2. Berichterstatter: Professor Dr. L. Fischer

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung

1. Direkte und indirekte Hämagglutination
2. Geschichte der indirekten Hämagglutination
3. Methodische Besonderheiten bei einzelnen Untersuchern
4. Methode des Tübinger Hygiene-Instituts

Es wurde die Aufgabe gestellt, diese Methode zu verbessern.

II. Eigene Untersuchungen

1. Material: Bakterienstämme, Blut, Seren
2. Methodik: Dargestellt an Hand des chronologischen Fortgangs der Untersuchungen
 - A) Vorversuche mit *Pseudomonas shigelloides*
 - B) Entwicklung der optimalen Methodik mit *S. newington*
 - C) Überprüfung der Ergebnisse mit sechs weiteren Bakterienstämmen
 - D) Vergleichende Agglutinationsergebnisse

III. Besprechung der Ergebnisse

IV. Zusammenfassung

V. Literaturverzeichnis



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40153517_0178

U n t e r s u c h u n g e n z u r M e t h o d i k d e r i n d i r e k t e n H ä m a g g l u t i n a t i o n

I. E i n l e i t u n g

1. Direkte und indirekte Hämagglutination

Gewisse Bakterien- und Virusarten sind dazu befähigt, auf menschliche oder tierische Erythrozyten dergestalt einzuwirken, daß diese zur Agglutination gebracht werden.

Man bezeichnet dies als d i r e k t e Hämagglutination, im angelsächsischen Schrifttum aktive Hämagglutination genannt.

Als Ursache dieses Phänomens wird angenommen, daß diese Bakterien und Viren vielleicht konglutinierend wirkende Substanzen abzugeben vermögen oder enzymatisch auf gewisse Bestandteile der Erythrozytenoberfläche wirken (H a n - s e n , 1957).

Die serologische Auswertung dieses Reaktionsgeschehens fand im Jahre 1941 im H i r s t - Test eine erfolgreiche Anwendung zur Serodiagnose von Viruserkrankungen. In der Folgezeit zeigte sich, daß auch noch andere Viren diese hämagglutinierenden Fähigkeiten besitzen, außerdem folgende Bakterienarten: einige Rotlaufstämme, einige wenige Stämme von Mycobact. tuberculosis, zahlreiche Coli-, Salmonella-, Alkalescens-Dispar-, Pest-, Listeriabakterien und ganz besonders ausgeprägt Anaerobier (Cl. perfringens, Cl. novyi, Cl. septicum und Cl. chauvoei). Aus der Gruppe der Protozoen sind die Toxoplasmen zu nennen. (H a l l m a n n , 1961).

Die i n d i r e k t e , bedingte oder passive Hämagglutination kommt dadurch zustande, daß an die Oberfläche von Erythrozyten zunächst gelöste Antigene adsorbiert werden. Man bezeichnet diesen Vorgang als Sensibilisierung der Erythrozyten. Eine nun erfolgende Antigen-Antikörper-Reaktion, mit einer Bindung der homologen Antikörper an das Antigen, beteiligt die Erythrozyten im Sinne der Hämagglutination.

Durch diesen Kunstgriff gelingt es also, an Stelle einer vielleicht nur schwer nachweisbaren Präzipitation, eine mit bloßem Auge gut sichtbare Agglutination von Erythrozyten zu erhalten.

M i e s c h e r und V o r l ä n d e r (1961) erklären den Vorgang der indirekten Hämagglutination mit der Annahme, daß die bivalenten Antikörper als Bindeglieder zwischen den antigensensibilisierten Erythrozyten dienen und Zellkonglomeratbildung bewirken. Durch Verringerung des Hydratationswassers kommt es zum Ausfallen der Agglutinate.

Die indirekte Hämagglutination ist wahrscheinlich eine der empfindlichsten Reaktionen, die in der Immunologie bekannt sind, und mit ihrer Hilfe gelang die Entdeckung und Titrierung von Antikörpern gegen zahlreiche Mikroorganismen, einschließlich der Viren, Protozoen und Pilze.

2. Geschichte der indirekten Hämagglutination

Das Prinzip für diese neue Methode zum serologischen Nachweis von Antikörpern oder Antigenen wurde erstmals im Jahre 1947 von K e o g h , N o r t h und W a r b u r t o n angegeben. Sie stellten fest, daß der aus den Bakterienleibern von Haemophilus influenzae mittels Salzlösungen gewonnene Extrakt eine Substanz enthält, die an Erythrozyten adsorbiert werden kann. Die derart modifizierten Zellen wurden daraufhin von typspezifischen Antiseren zur Agglutination gebracht. Die weiteren Untersuchungen der genannten Autoren (K e o g h , N o r t h , 1948) bestätigten die Annahme, daß es sich bei dem sensibilisierenden Agens um Kapselpolysaccharide der Bakterien handelte. Die Reindarstellung gelang durch Extraktion mit 90 %igem Phenol. Im weiteren Verlauf ihrer Untersuchungen isolierten sie außerdem die Polysaccharide von Meningokokken, Staphylokokken und Salmonella typhi. Bereits im Jahre 1942 hatte F e e m a n n mitgeteilt, daß die serologisch wirksame Komponente des Salmonella typhi-O-Antigens ein stickstoffreies Polysaccharid ist.

Keogh, North und Warburton gaben als Nebenergebnis ihrer Untersuchungen außerdem eine Hämagglutinations - Hemmreaktion an. Sie basierte auf der Beobachtung, daß nach der Sensibilisierung der Erythrozyten überschüssig vorhandenes Antigen die indirekte Hämagglutination mindert oder völlig hemmt. Es zeigte sich, daß durch Mischen einer bestimmten Antikörpermenge mit abfallenden Antigenkonzentrationen und

anschließender Zugabe von sensibilisierten Erythrozyten exakt diejenige Antigenverdünnung zu ermitteln war, welche die Hämagglutination gerade noch zu hemmen vermochte. Praktische Anwendung fand dieses Prinzip zum Nachweis kleinster Antigenmengen im Liquor von Meningitis-Patienten.

Ausgehend von den grundlegenden Versuchen genannter Autoren teilten M i d d l e b r o o k und D u b o s 1948 einen Hämagglutinationstest zur serologischen Diagnose der Tuberkulose mit. Dieser Test erlebte in der Folgezeit zahlreiche Modifikationen und wurde zum klassischen Vorbild für spätere Untersucher.

Middlebrook und Dubos benutzten Hammelerythrozyten und einen wässerigen Extrakt von getrockneten Tuberkelbakterien, berichteten aber gleichzeitig, daß auch im Alttuberkulin sensibilisierende Substanzen enthalten seien. Es zeigte sich, daß der sensibilisierende Faktor hitzestabil und in der Polysaccharidfraktion der Bakterien eingeschlossen war. Zu dieser Feststellung kamen Middlebrook und Dubos durch Verwendung der erwähnten indirekten Hämagglutinations-Hemmreaktion.

Zahlreiche Arbeiten befassten sich mit der Verbesserung dieses Testes zum Tuberkulosenachweis.

So entwickelten S c o t t und S m i t h (1950) eine vereinfachte Modifikation unter Verwendung von Alttuberkulin. P o p p (1952) benutzte eine Kombination von Hämagglutinations-Hämolyse-Reaktion.

Bereits früher (K e o g h , N o r t h , W a r b u r t o n , 1947; K e o g h , N o r t h , 1948) war die Verwendung von menschlichen, rh-negativen O-Erythrozyten an Stelle der Hammelerythrozyten empfohlen worden. Dies schlugen S o h i e r , T r i m b e r g e r und J u i l l a r d (1950) für den Hämagglutinationstest auf Tuberkulose vor, da damit die Absorption der Patientenseren mit nichtsensibilisierten Erythrozyten, zur Entfernung von heterophilen Schafantikörpern, entfällt.

Die Leistungsfähigkeit der Middlebrook-Dubos-Reaktion zum Nachweis der Tuberkulose entspricht nach den Untersuchungen von S a c h s e (1959) heute ungefähr derjenigen der Widal- und Wassermann-Reaktion. T a k a h a s h i

(1961) bestätigte dieses Ergebnis und untersuchte außerdem die Spezifität des noch zu erwähnenden Boyden-Tests in der Serologie der Tuberkulose.

N o r d e n (1949) wandte die Middlebrook-Dubos-Reaktion in geringfügiger Abänderung zum Histoplasmose-Nachweis an.

F i s h e r und K e o g h (1950) schufen durch Zugabe von Meerschweinchenkomplement zu einem Gemisch von antigensensibilisierten Hammelerythrozyten und homologen Antikörpern einen indirekten Hämolysetest von sehr großer Empfindlichkeit zum Nachweis von Antikörpern gegen Tuberkelbakterien. Sie nahmen an, daß der Mechanismus der Reaktion dem der Bakteriolyse ähnlich sei.

A d l e r (1950) bestätigte in eigenen Untersuchungen mit *E. coli* und *S. typhi* diese Beobachtungen. T h o m a s und M e n n i e (1950) kamen bald danach zu ähnlichen Ergebnissen und nannten die Reaktion Polysaccharid-Lysis-Test (P.L.T.). Sie gewannen sensibilisierungsfähige Polysaccharide von verschiedenen Bakterienarten durch Extraktion mit Eisalkohol, mittels der lytischen Eigenschaften von *Streptomyces albus* und durch Papainandauung. Diese Methode wurde speziell zum Nachweis von Antikörpern gegen Typhus, Tuberkulose und Gonorrhoe verwendet.

H a y e s (1951) , die mit Polysaccharidextrakten von *E. coli*, *Sh. sonnei*, *C. diptheriae* und *Staph. aureus* und *albus* arbeitete, verglich in parallellaufenden Untersuchungen indirekte Hämagglutination und indirekte Hämolyse. Die grose Empfindlichkeit des Hämolyse-Testes wurde bestätigt und die Zweckmäßigkeit darin gesehen, daß bei ausreichender Komplementmenge auch noch mit kleinster Antikörpermenge eine einwandfreie Reaktion zu erzielen ist. Für die indirekte Hämagglutination wurde gezeigt, daß die erhaltenen Serumtiter von der Konzentration der zur Sensibilisierung verwendeten Polysaccharide und von der Sensibilisierungszeit abhängig sind. Aus der Tatsache, daß bei multipler Sensibilisierung der Erythrozyten keine Störung der einzelnen spezifischen Reaktionen eintrat, schloss die Autorin, daß jeweils nur ein kleiner Teil der Zelloberfläche in die Sensibilisierung einbezogen werde. Es wurde außerdem zum Teil eine opti-

male Serumverdünnung beobachtet, analog den Verhältnissen bei der Präzipitation, wobei jedoch keine völlige Hemmung bei niedriger Serumverdünnung eintrat. Die Polysaccharidfraktionen wurden nach Verfahren von H a y e s und S t a n l e y (1950) isoliert, einmal mechanisch, durch Zerreiben der Bakterienkörper mit Sand, zum anderen durch Versetzen mit Glycin. Beide Male wurde mit einem Chloroform-Amylalkoholgemisch extrahiert.

Zur gleichen Zeit gaben F i s h e r (1950) ein Hämagglutinationsverfahren für H. pertussis und A l e x a n d e r , W r i g h t und B a l d w i n (1950) für Past. tularensis an. Diese gewannen die Polysaccharide durch Phenolextraktion. Vergleichende Untersuchungen der Bakterienagglutination mit denselben Seren zeigten, daß die Hämagglutinations- und die Agglutinationsstiter stark voneinander abwichen. Sie schlossen daraus, daß mit den beiden Reaktionen verschiedene Serumaktivitäten titriert werden, während sie Präzipitation und Hämagglutination ihrem Wesen nach als kongruent ansahen. F e i n b e r g und W r i g h t (1951), die ebenfalls mit Past. tularensis-Polysacchariden arbeiteten, erhielten mit Human-O, A, B-, Hühner-, Kaninchen-, Hammel-, Meerschweinchen-, Maus- und Affenerythrozyten gleichwertige Hämagglutinationsergebnisse. Zur Konservierung des zur Reaktion verwendeten Blutes benutzten sie gleiche Volumenteile Alsever-Lösung, wodurch Haltbarkeit für mehrere Wochen erzielt wurde. In späteren Untersuchungen (W r i g h t , F e i n b e r g , 1952) verbesserten sie die von A l e x a n d e r , W r i g h t und B a l d w i n (1950) angegebene Methode und stellten dabei fest, daß die normalen Zellantigene und -rezeptoren durch das Einwirken der Polysaccharide auf die Erythrozyten nicht verändert werden. Die sensibilisierenden Faktoren der benutzten Polysaccharide erwiesen sich als hitzestabil im neutralen pH-Bereich, wurden jedoch im sauren oder alkalischen Bereich bei 100° C zerstört.

Zur serologischen Diagnostik bei Streptokokkeninfektionen und akutem rheumatischem Fieber wandte K i r b y (1951) die nur geringgradig veränderte Originalmethode von Middlebrook und Dubos an.

Während A d l e r (1950) und T h o m a s (1950) eine Hämagglutinations- bzw. Hämolysetest zur Bestimmung von O-Antikörpern in der Salmonellen-Serologie geschaffen hatten, gab S p a u n (1951) einen solchen für die Vi-Antikörperbestimmung an. Er verwendete einen wässrigen Extrakt von *S. typhi*, der seine serologischen Eigenschaften bei -20 Grad-Lagerung ohne jegliche Konservierung über Monate beibehielt und, im Gegensatz zur üblichen Vi-Agglutination, konstante Resultate lieferte. Hammel- und Humanerythrozyten waren in der Empfindlichkeit gleichwertig. Während bei den anfänglichen Untersuchungen Stämme Verwendung fanden, die nur wenig O- und H-Antigene besaßen, zeigte sich bei späteren Versuchen mit antigenkompletten Stämmen (S p a u n , 1952), daß durch Änderung der Extraktionsmethode Sensibilisierung der Erythrozyten nur gegen Vi-Seren möglich ist. Je nachdem, ob er lebende Kulturen, dicke, 1 Std. lang auf 100°C erhitzte Bakteriensuspensionen in physiolog. NaCl-Lösung oder dünne, ebenso behandelte Suspensionen benutzte, erhielt er verschiedene Hämagglutinationstypen. Mit den erhitzten dünnen Suspensionen zeigte sich Vi- und O-Hämagglutination, während bei Verwendung der lebenden Kulturen und der erhitzten dicken Suspensionen ausschließlich der Vi-Hämagglutinationstyp auftrat, wobei allerdings der Hämagglutinationstiter für die gekochte Suspension um ein Mehrfaches höher lag. Als Besonderheit, im Gegensatz zu den bisherigen Feststellungen, ergab sich bei seinen Untersuchungen, daß ein Überschuss von Vi-Antigen nach der Sensibilisierung die Hämagglutination nicht im Sinne einer Hemmung beeinflusst, ein Waschen der sensibilisierten Erythrozyten sich demnach erübrigt.

Vergleichbares stellte W e i n b a c h (1959) bei der indirekten Hämagglutination mit *Sh. sonnei* fest. Es kam dabei sogar zu einer Intensivierung der Reaktion bei Antigenüberschuss.

W e b s t e r , L a n d y und F r e e m a n (1952) gelang durch einfache Äthanol-Salz-Fraktionierung mit anschließender Essigsäurehydrolyse die Reindarstellung von *E. coli*-Vi-Antigen. Es erwies sich als ziemlich starke Säure,

jedoch ohne Harn-, Schwefel- oder Phosphorsäurebestandteile; Stickstoff- und Azetylgruppen waren enthalten, jedoch nicht in der üblichen Form des N-azetylhexosamins. Weitere Untersuchungen (L a n d y , W e b s t e r , 1952) erwiesen die ausgezeichnete Eignung des Rein-Antigens für die indirekte Hämagglutination. L a n d y und L a m b (1953) bauten die Methodik der Vi-Hämagglutination weiter aus. Sie arbeiteten dabei mit dem, nach der Methode von W e b s t e r , L a n d y und F r e e m a n (1952) hergestellten E-coli-Vi-Reinantigen und benutzten dieses als spezifisches Reagens unter anderem zum Nachweis von Vi-Antikörpern im Serum von Typhusdauer ausscheidern. Sie ermittelten dabei eine 3-6 fach höhere Empfindlichkeit dieser Methode gegenüber der konventionellen bakteriellen Agglutination, wobei allerdings bei der Untersuchung der Typhusseren die Titer stärker variierten.

1951 teilte B o y d e n eine Methode mit, die es ermöglichte, auch Protein-Antigene an Erythrozyten anzulagern. Dies war nach der Entdeckung der indirekten Hämagglutination durch Keogh, North und Warburton, und deren technische Perfektionierung durch Middlebrook und Dubos der weitere bedeutende Schritt. Bis dahin war nur die Adsorption von extrahierten Antigen-Polysacchariden oder von Antigenen, die eine Polysaccharidfraction einschlossen, möglich gewesen. Boyden gelang es nun durch Vorbehandlung der Erythrozyten mit verdünnter Tanninsäure, auch Antigene von Proteincharakter anzulagern. Er konnte auf diesem Wege auch die Absorptionsfähigkeit der Erythrozyten für Tuberkulin-extrakte steigern. W o e r n e r (1956) deutet die Tanninwirkung auf die Erythrozyten als eine Ladungsänderung an deren Oberfläche.

Auf die Mitteilung von Boyden hin folgten zahlreiche Untersuchungen mit Tannin. Außerdem wurden eine Anzahl von anderen Chemikalien und Fermenten gefunden, die das Absorptionsvermögen der Erythrozyten für Proteine ebenfalls erhöhten. Es seien hier nur einige genannt: Formalin (C o l l e , F a r r e l , 1955; W e i n b a c h , 1959), Bromelin, Perjodsalzlösungen, Papain (S c h i f f , S e i d l i t z , 1954), Trypsin, Erepsin, Chymotrypsin, Pepsin.

Es soll jedoch darauf nicht ausführlicher eingegangen werden, da sich die eigenen Untersuchungen nicht mit der Anlagerung von Protein-Antigenen beschäftigen.

N e t e r und Mitarbeiter, die in der Folgezeit zahlreiche Arbeiten über die indirekte Hämagglutination veröffentlichten, zeigten 1952, daß die gruppenspezifischen Antigene von E. coli - O 55 und - O 111, die für zwei human-medizinisch wichtige Coligruppen charakteristisch sind, mit ihr nachgewiesen werden können (N e t e r , B e r t r a m , A r b e s m a n n). Die Antigene ließen sich nur aus erhitzten Bakterienabschwemmungen anlagern. Bei weiteren Untersuchungen bestätigte sich, was schon von H a y e s (1951) festgestellt worden war, daß nämlich die Adsorption der Antigene eine Funktion ihrer Konzentration, der Einwirkungs-dauer auf die Erythrozyten und der Konzentration der Erythrozytensuspension ist. Nach dem Trennen der Bakterien-suspension in Sediment und Überstand vor dem Erhitzen, zeigte sich, daß der Überstand sensibilisierungsinaktiv war, bei Trennung nach dem Erhitzen jedoch wirksamer als das Sediment. Daraus konnte abgeleitet werden, daß durch das Erhitzen entweder die Antigene freigesetzt oder ein Hemmfaktor beseitigt wird. Neter kam zu dem Schluss, daß die hitzelablen Hüllenantigene (B-Antigene) eine Maskierung bewirken. Auch in späteren Untersuchungen (N e t e r , G o r z y n s k i , Z a l e w s k i , R a c h m a n , G i n o , 1954) beschäftigten sich N e t e r und Mitarb. mit der Methodik des E. coli-Nachweises. Simultan- und Sukzessivsensibilisierung mit verschiedenen Antigenen (N e t e r , B e r t r a m , Z a k , M u r d o c k , A r b e s m a n n , 1952) ergaben mit jedem der homologen Antiseren komplette Hämagglutination. Neter konnte in diesem Zusammenhang auch nachweisen, daß die mit einem oder mehreren Antigenen sensibilisierten Erythrozyten keine Änderung ihrer Agglutinabilität durch blutgruppen- und Rh-spezifische Antikörper erfahren. Damit fanden die Ergebnisse von Feinberg und Wright (1951) eine Bestätigung.

C h e n (1952) teilte als erster einen Hämagglutinationstest für Past. pestis mit. Das Antigen ist in alten

Bouillonkulturen, in Extrakten von abgetöteten und getrockneten Organismen und in Alkoholpräzipitationen enthalten. Das rohe Antigen gibt eine stark positive Molisch-Reaktion und hat einen niedrigen N-Gehalt. Es handelt sich wahrscheinlich um ein Polysaccharid.

1953 machte B o y d e n (1953) den interessanten Versuch, aus Tuberkulin extrahierte Polysaccharide an Blutzellen in vivo anzulagern. Er verwendete dabei für sensibilisierungsfähige Substanzen bakteriellen Ursprungs den Terminus "Haemosensitins" (B o y d e n , S u t e r , 1952). Es zeigte sich, daß eine Sensibilisierung im strömenden Blut, ungeachtet der Anwesenheit von unverdünntem Plasma, stattfinden kann, wenn nur die Konzentration der Antigene hoch genug ist. Die Fähigkeit der Antigenadsorption ist auch Leukozyten und Lymphozyten zu eigen. Die mit der Hämagglutination erzielbaren Titer fielen erst nach mehreren Tagen wieder ab. Später gelang es D e G r e g o r i o (1955) in vitro, an Leukozyten, Milz-, Leber- und Nierenzellen Salmonellen-Antigene zu adsorbieren und diese damit spezifisch agglutinabel durch Salmonellen-Antikörper zu machen.

N e t e r und Z a l e w s k i (1953) wiesen in Hämagglutinationsversuchen mit *E. coli* die Erfordernis der Anwesenheit von Elektrolyten für die Sensibilisierung der Erythrozyten nach. Sie erfolgt bei geeigneten Konzentrationen von NaCl, KCl, CaCl_2 und Na-Citrat, und es zeigte sich, daß innerhalb gewisser Grenzen die Konzentration der Elektrolyte umso größer sein muss, je kleiner die Konzentration der zur Sensibilisierung benutzten Antigene ist. N e t e r und W a l k e r (1954) verwendeten die schon früher zum *E. coli*-Nachweis geschaffene Methode zu Versuchen mit *Sh. sonnei*-Rohantigenen. Sie verkürzten dabei die Versuchsdauer durch abschließendes Zentrifugieren und damit sofort mögliches Ablesen der Reaktionsergebnisse. Bei weiteren Untersuchungen mit *Sh. dysenteriae* (N e t e r , G o r z y n s k i , 1954) zeigte sich, daß das Rohantigen, also der ganze Antigenkomplex, stärker sensibilisierend wirkte, als die gereinigte Polysaccharidkomponente.

Während S p a u n (1951, 1952) mit wässrigen Extrakten von *S. typhi* arbeitete, führte F u l t h o r p e (1954) die Sensibilisierung von Hammelblut mit säureextrahierten Salmonellen-Polysacchariden durch. Die Extraktion erfolgt einmal in der Kälte, bei 0° C, mit n/2 Trichloressigsäure, zum anderen, bei 100°C, mit gelöstem 20%igen w/v Eisessig. Die Ausfällung der Polysaccharide geschieht beide Male mit Äthanol und Äthyläther. Anschließend wird auf einen neutralen pH-Wert eingestellt. Bei diesen Untersuchungen wurde die optimale Polysaccharid-Sensibilisierungszeit ermittelt und eine Definition für die "kleinste vollsensibilisierende Dosis (MSD)" angegeben. Fulthorpe fand bestätigt, daß bei Verwendung dieser MSD eine enge Korrelation zwischen den Serumtitern der indirekten Hämagglutination und den Agglutinationstitern der Organismen besteht, aus denen die Polysaccharide extrahiert wurden. Allerdings erwies sich die indirekte Hämagglutination als die weit empfindlichere Methode. Die Titerunterschiede zwischen heiß- und kaltextrahierten Polysacchariden waren gering. Bei Simultansensibilisierung mit verschiedenen Antigenen kam Fulthorpe zum Schluss, daß nur eine beschränkte Anzahl von Polysaccharidmolekülen adsorbiert werden kann und daß keine weiteren Antigene fest gebunden werden können, wenn die Oberflächenrezeptoren der Erythrozyten voll in Anspruch genommen sind. Dies steht im Gegensatz zu früheren Beobachtungen von Hayes (1951). Auch L a n d y (1954) kam zu anderen Ergebnissen. Er fand, daß sechs verschiedene Antigene adsorbiert werden konnten (*S. typhi*, *E. coli*, *Past. tularensis*, *Ps. aeruginosa*, *Serr. marcescens* und *Dipl. pneumoniae*), ohne daß das serologische Reaktionsvermögen für das einzelne Antigen darunter litt. Es zeigte sich bei seinen Versuchen weiter, daß es nicht möglich war, die Erythrozytenoberfläche mit einem einzigen Antigen völlig abzusättigen und damit die Adsorption weiterer Antigene zu blockieren.

Landy arbeitete dabei mit der 250 fachen MSD. Er schloss aus diesen Beobachtungen, daß verschiedenartige Rezeptoren oder Bezirke der Erythrozytenoberfläche für

die einzelnen Antigene vorhanden sind. Eine Blockade für weitere Antigene war auch nach sukzessiver Anlagerung von elf Antigenen nicht festzustellen. Es fanden sich allerdings auch Faktoren, die die Adsorption beeinflussen. So gelang es ihm durch teilweises Entfernen des Lipoidanteiles des Lipo-Polysaccharides von *S. typhi*-O-Antigen mittels Erhitzen oder Alkalibehandlung, die Sensibilisierungskraft um das 100 - 1000 fache zu steigern. In späteren Untersuchungen (L a n d y , T r a p a n i , C l a r k , 1955) ermittelte er als optimales Aktivierungsverfahren eine Behandlung mit 0,02 NaOH, bei 37°C über 18 Stunden. Das isolierte O-Antigen von *S. typhi* wurde als ein phosphoryliertes Lipo-Polysaccharid charakterisiert, mit 67% Polysaccharid- und 33% Lipoidanteil. Es war im wesentlichen proteinfrei, wobei der mit 0,6% enthaltene Stickstoff zum größten Teil auf Glucosamin entfällt. Demgegenüber beschreibt S t a u b (1954) ein gereinigtes O-Antigen von *S. typhi*, das 0,6% Stickstoff, 3-4% Lipide und 96% Polysaccharide aufweist. K a u f f m a n n , L ü d e r i t z , S t i e r l i n und W e s t p h a l (1960) analysierten die Hydrolysate von gereinigten O-Antigen-Lipopolysacchariden zahlreicher Salmonella-Kulturen hinsichtlich ihrer Zuckerbausteine. Es fanden sich Galaktosamin, Glucosamin, Heptose, Galaktose, Glucose, Mannose, Fucose, Rhamnose, Abequose, Colitose, Paratose, Tyvelose und ein noch unbekannter Zucker. Sie stellten ferner fest, daß sich bei den O-Antigenen der Salmonella-Gruppe 16 verschiedene Zuckerkombinationen finden, also 16 Chemotypen bestehen, denen eine große Zahl von Serotypen gegenübersteht. Der einfachste Chemotyp enthält vier Zuckerbausteine, die komplizierteren bis zu sieben. Vergleichende analytische Untersuchungen dieser Art mit Salmonella-, Arizona- und Escherichia-O-Antigenen schlossen sich an (W e s t p h a l , K a u f f m a n n , L ü d e r i t z und S t i e r l i n , 1960; K a u f f m a n n , B r a u n , L ü d e r i t z , S t i e r l i n und W e s t p h a l , 1960; K a u f f m a n n , J a n n , K r ü g e r , L ü d e r i t z und W e s t p h a l , 1962), wobei sich nahe serologische Verwandtschaft im Vorliegen gleicher Zuckerbausteine ausdrückte.

N e t e r , W e s t p h a l , L ü d e r i t z , G o r z y n s k i und E i c h e n b e r g e r (1956) bestätigten die Beobachtungen von Landy bezüglich der Aktivierung durch Hitze- oder NaOH-Behandlung in Versuchen mit Lipo-Polysacchariden von E. coli und S. abortus-equi. Es stellte sich dabei heraus, daß längerdauerndes Einwirken von NaOH zwar nicht die Antigeneigenschaften und die Sensibilisierungsfähigkeit verändert, jedoch die Toxizität und die Pyrogenität. Nach der Anschauung N e t e r s (1956) beruht die Hitzewirkung auf zwei voneinander unabhängigen Effekten: Überführen von O-Antigenen von den Bakterienzellen in die Lösungsflüssigkeit und Aktivieren der gelösten Antigene. Dieser Effekt kann bei Verwendung gereinigter Lipo-Polysaccharide beobachtet werden. L a n d y (1954) stellt die Forderung nach möglichst hoher Reinheit der Antigene und ist der Meinung, daß der Test nicht besser ausfalle, als die Antigengewinnung war. Er erwähnt jedoch einschränkend, daß auch mit Bakterien-Rohextrakten und Kulturfiltraten brauchbare Ergebnisse zu erzielen sind. Bei seinen Untersuchungen zeigte sich außerdem, daß wahrscheinlich viele Bakterien dominierende Antigene besitzen, die beim üblichen Agglutinationstest nicht reagieren, aber durch Extraktion reaktionsfähig gemacht werden. Bei Versuchen mit Protein-Antigenen erwies sich, daß tanninsäurebehandelte Erythrozyten ihre Polysaccharidadsorptionsfähigkeit behalten. Damit ist Simultansensibilisierung mit beiden Antigentypen möglich.

S c h i f f und S e i d l i t z (1954) fanden bei Modifikation der Middlebrook-Dubos-Reaktion zum Tuberkulosenachweis durch Papainbehandlung der Erythrozyten eine außerordentliche Verstärkung der Agglutination. Dadurch war es ihnen möglich, eine Zentrifugiermethode zu entwickeln und damit eine erhebliche Verkürzung der Reaktion zu erzielen.

B r o d h a g e und F e y (1955) arbeiteten ebenfalls mit Tuberkulin, gaben aber gleichzeitig eine Methode zur Sensibilisierung mit Brucellen-Antigenen an. Sie benutzten Phenolextrakte und hitzebehandelte Bakteriensuspensionen von Bruc. abortus.

1956 brachte N e t e r in einer Übersicht über die bisherigen Erfahrungen mit der indirekten Hämagglutination eine Zusammenstellung der neugeschaffenen Terminologie und eine tabellarische Übersicht der Bakterienarten, mit denen eine Sensibilisierung der Erythrozyten gelungen war. Dabei wird festgestellt, daß bei fast allen adsorbierbaren Antigenen die chemische Analyse ergab, daß sie Polysaccharide sind oder zumindest Polysaccharide als serologisch aktive Komponente enthalten. Bei der Untersuchung der Absorptionsfähigkeit von Kaltblütererythrozyten (Alligator, Schlange, Axolotl und Fisch) stellten N e t e r , C o h e n , W e s t p h a l , L ü d e r i t z , H a r t (1957) und N e t e r , C o h e n , W e s t p h a l , L ü d e r i t z (1957) fest, daß eine Hämagglutination der mit Lipo-Polysacchariden sensibilisierten Erythrozyten nur nach Zugabe von Trypsin zu erzielen ist. Sie schlossen daraus, daß durch das Trypsin ein Inhibitor beseitigt wird, der mit der Hämagglutination als solcher und nicht mit der Anlagerung der Antigene interferiert (tiefes Einsinken der Antigene in die Erythrozytenoberfläche und damit Reaktionslosigkeit). Ähnliche Wirkung zeigte das Trypsin auf Human-Erythrozyten, aber auch Pankreas-Protease, Ficin und Papain, bei der von N e t e r und G o r z y n s k i (1959) angegebenen indirekten Staphylokokken-Hämagglutination. Es resultiert eine erhöhte Empfindlichkeit der Reaktion. Frühere Untersucher (K e o g h , N o r t h 1948, O e d i n g 1955, 1957) hatten ohne Enzymzusätze gearbeitet.

S i e b u r t h (1957, 1958) entwickelte zum Nachweis von Vogelsalmonellen eine Reagensglas- und eine Objektträgerhämagglutination, unter Verwendung von Hühnererythrozyten. Polyvalente Systeme, d.h. mit mehreren Antigenen sensibilisierte Erythrozyten, erwiesen sich dabei als ebenso empfindlich wie monovalente. S i e b u r t h (1961) gelang außerdem die Stabilisierung der sensibilisierten Hühnererythrozyten für die polyvalente Salmonellen-Hämagglutination durch Formalinzusatz. Die serologischen Eigenschaften einer 10%igen Erythrozytensuspension bleiben nach dieser Methode bei 5°C sechs Monate lang unverändert. Damit läßt sich eine ausreichende Standardisierung des Testes erzielen.

M c K e n n a hatte 1957 ebenfalls von einer Stabilisierung durch Formalinzusatz berichtet, benutzte jedoch Proteinantigene zur Sensibilisierung.

1960 gab R o e m e r einen Test zum Antikörpernachweis bei Enterokokkeninfektionen an, der sich als weit spezifischer als die Präzipitation erwies.

C o h e n , N i s o n o f f , H e r m e s , N o v e r o s s und L o c k i e (1961) berichteten in jüngster Zeit, daß es ihnen gelungen sei, nach Sensibilisierung von Alligatorerythrozyten mit spezifisch reagierenden Globulinen eine Agglutination durch Rheumafaktoren zu erzielen.

3. Methodische Besonderheiten bei einzelnen Untersuchern

Das Ziel der hier gestellten Aufgabe war, die vorliegende Methode des Tübinger Hygiene-Institutes zu verbessern, da die bisherigen Ergebnisse der indirekten Hämagglutination noch stark variierten. Aus diesem Grunde scheint es wichtig, die Besonderheiten der Methodik einiger Untersucher darzustellen, wobei sich die Darstellung, entsprechend dem Thema der vorliegenden Arbeit, vor allem auf indirekte Hämagglutinations-Teste mit Salmonellen, einschließlich einiger Vi-Stämme, Shigellen und Brucellen beschränkt.

a) Methode nach K e o g h , N o r t h und W a r b u r - t o n .

Antigene von *H. influenzae*, Meningokokken, Staphylokokken und *S. typhi*. Die Extraktion der spezifischen Polysaccharide geschieht mit 90%igem Phenol.

Erythrozyten von Mensch oder Huhn.

Sensibilisierung: 1 Teil gewaschener, abzentrifugierter Erythrozyten wird zu 10 Teilen einer 0,1%igen Polysaccharidlösung gegeben. Nach der Sensibilisierung zweimaliges Waschen zur Entfernung des überschüssigen Antigens und Herstellen einer 5%igen Erythrozytensuspension mittels physiol. NaCl-Lösung.

Hämagglutination: 1 Teil dieser Suspension wird zu 10 Teilen einer Verdünnungsreihe des spezifischen Antiserums gegeben. Ablesung nach Reaktionseintritt.

b) Methode nach M i d d l e b r o o k und D u b o s .

Antigene von Mycobact. tuberculosis. Nach 14-tägigem Wachstum auf Nährbouillon werden die Kulturen filtriert und getrocknet. Nach Phenol-Azeton-Behandlung abermals Trocknen und Herstellen einer Suspension mittels NaCl-, Na_2HPO_4 - und Methanol-Lösung. Nach Entfernen der Zellkörper wird der Extrakt gegen Leitungswasser und Aqua dest. dialysiert.

Erythrozyten: Hammelblut wird in modifizierte Alsever-Lösung verbracht und dreimal in 6 Teilen isotonomischer NaCl-Lösung gewaschen.

Sensibilisierung: 1 Teil der abzentrifugierten Erythrozyten wird zu 20 Teilen eines neutralen, isotomischen Extraktes von Tuberkelbazillen gegeben und diese Suspension für 2 Std. in ein Wasserbad von 37°C verbracht. Nach dem Abzentrifugieren wird dreimal mit 30 ml NaCl-Lösung gewaschen.

Serumabsorption: Zu 10 Teilen einer 1:2 Serumverdünnung wird 1 Teil abzentrifugierter, gewaschener, nichtsensibilisierter Erythrozyten gegeben. Nach 20 Min. Aufenthalt bei Zimmertemperatur wird zentrifugiert und der Überstand nochmals auf die gleiche Art behandelt.

Hämagglutination: Zu der Verdünnungsreihe mit absorbiertem Serum werden gleiche Teile einer 0,5%igen Erythrozytensuspension gegeben. Nach 2 -stündigem Aufenthalt bei 37°C und anschließendem Stehenlassen über Nacht bei Zimmertemperatur Ablesen der Röhrchen.

c) Methode nach H a y e s .

Antigene von E. coli, Sh. sonnei, C. diptheriae, Staph. aureus und albus und Str. pneumoniae. Die Freilegung der spezifischen Polysaccharidfraktion geschieht einmal mechanisch durch Zerreiben der Bakterienkörper mit Sand, zum anderen durch Zusatz von Glycin. Dann folgt eine komplizierte Aufeinanderfolge von Präzipitationen mit Äthanol und Extraktionen mit Äthanol-Äther, Aqua dest. und Chloroform-Amylalkohol. Nach abschließendem Waschen mit Alkohol und Trocknen resultiert als Polysaccharidfraktion ein feiner weißer Puder (H a y e s und S t a n l e y).

Erythrozyten: Vom Hammel; dreimaliges Waschen in 0,9% iger NaCl-Lösung. Die Erythrozyten sind bei 4°C fünf Tage lang für die Reaktion verwendbar, nach Boraxbehandlung bei 0°C sechs Wochen lang.

Sensibilisierung: Eine 6%ige Erythrozytensuspension wird benutzt. Die Konzentration der zugesetzten Polysaccharide ist bei jeder Bakterienart verschieden, ebenso abhängig von der Sensibilisierungsdosis des betreffenden Polysaccharides (S.D.P.). Sie ist ausgedrückt als der reziproke Wert der benutzten Verdünnung. Nach 1-stündiger Inkubation bei 37°C wird zentrifugiert und dreimal mit physiolog. NaCl-Lösung gewaschen.

Hämagglutination: Gleiche Teile einer 1%igen sensibilisierten Erythrozytensuspension werden zu der Serumverdünnungsreihe gegeben. Nach 18 Std. Stehenlassen bei Zimmertemperatur wird abgelesen.

d) Methode nach S p a u n .

Antigene von *S. typhi*, O- und Vi-Stämme. Die Kulturabschwemmung wird 1 Std. lang auf 100°C erhitzt, dann entfernen der Bakterien durch Zentrifugieren, 1 Std. bei 10 000 U./Min.

Erythrozyten: Vom Hammel, dreimal gewaschen in physiolog. NaCl-Lösung.

Sensibilisierung: 10 Teile Antigenlösung werden mit 1 Teil abzentrifugierter Erythrozyten versetzt. Dieses Gemisch wird 1 Std. lang bei 37°C belassen. Im Anschluss daran wird zweimal gewaschen.

Hämagglutination: Zu der Serumverdünnungsreihe werden gleiche Teile einer 2%igen Erythrozytensuspension gegeben. Nach einer Inkubation von 1 Std. bei 37°C wird sofort abgelesen.

e) Methode nach L e M i n o r und Mitarb.

Antigene von *S. typhi*, *E. freundii*, Typ Ballerup und *E. coli*. Die Aufschwemmung der Bakterien erfolgt in physiolog. CaCl-Lösung, die Abtötung durch Erwärmen auf 56°C für 1 Std. Entfernen der Bakterienkörper durch Zentrifugieren.

Sensibilisierung: Der Überstand der Bakterienaufschwemmung wird zu einer 2%igen Suspension der gewaschenen Erythrozyten gegeben und eine Kontaktzeit von 2 Std. im Wasserbad von 37°C eingehalten. Nach Abzentrifugieren der Erythrozyten werden sie dreimal in physiol. NaCl-Lösung gewaschen.

Hämagglutination: Evtl. Serumabsorption mit unbehandelten Erythrozyten. Zu 0,2 ml der Serumverdünnungsreihe wird 0,1 ml einer 1%igen Erythrozytensuspension gegeben. Nach einer Inkubation von 1 Std. im 37°C -Wasserbad wird sogleich abgelesen. Zweite Ablesung am folgenden Tag.

f) Methode nach F u l t h o r p e .

Antigene von verschiedenen Salmonellenarten. Nach 48-stündigem Wachstum bei 37°C wird mit physiol. NaCl-Lösung abgeschwemmt. Die Polysaccharidfraktion wird durch aufeinanderfolgende Behandlung mit Äthanol, Azeton, Trichloressigsäure und Äthyläther extrahiert.

Erythrozyten: Vom Hammel.

Sensibilisierung: Gleiche Teile einer 10%igen Erythrozytensuspension und der verdünnten Polysaccharidlösung werden gemischt und 3 Std. lang im 37°C -Wasserbad belassen. Nach dem Zentrifugieren wird dreimal mit 20 Teilen physiol. NaCl-Lösung gewaschen. Dann Resuspendierung der Erythrozyten auf das ursprüngliche Volumen.

Hämagglutination: Zu der Serumverdünnungsreihe von je 1 ml pro Röhrchen wird je ein Tropfen der sensibilisierten Erythrozytensuspension gegeben. Danach Einstellen ins 37°C -Wasserbad für 30 Min. und Aufbewahren über Nacht bei 4°C ; dann wird abgelesen.

g) Methode nach N e t e r und W a l k e r .

Antigene von Sh. sonnei. Nach 18-stündigem Wachstum bei 37°C in einer Kolle-Flasche wird mit 25 ml physiol. NaCl-Lösung abgeschwemmt. Die erhaltene Suspension wird 1 Std. lang auf 100°C erhitzt.

Erythrozyten: Von Mensch oder Tier; es wird defibrinisiertes oder Oxalat-Blut verwendet, das dreimal gewaschen wird.

Sensibilisierung: Zu einer 2%igen Erythrozytensuspension wird dasselbe Volumen Antigenlösung in einer Verdünnung von 1:10 gegeben und das Gemisch für 30 Min. ins 37°C-Wasserbad verbracht. Nach dem Zentrifugieren wird dreimal mit physiol. NaCl-Lösung gewaschen.

Hämagglutination: Zu der Serumverdünnungsreihe werden gleiche Teile der 2%igen Erythrozytensuspension gegeben und das Ganze 30 Min. lang bei 37°C gehalten. Dann wird 2 Min. lang bei 1500 U./Min. zentrifugiert und abgelesen.

h) Methode nach L a n d y und Mitarb.

Antigene von *S. typhi*. Aktivierung des Antigens durch Erhitzen auf 100 C oder durch Alkalibehandlung.

Erythrozyten: Vom Hammel oder vom Menschen der Blutgruppe O; dreimaliges Waschen mit 10 Teilen physiol. NaCl-Lösung.

Sensibilisierung: Gleiche Teile einer 10%igen Erythrozytensuspension und der Antigenlösung werden zusammengebracht und 2 Std. lang im 37°C-Wasserbad gehalten. Dabei wird alle halbe Stunde aufgeschüttelt. Anschließend wird dreimal mit 10 Teilen physiol. NaCl-Lösung gewaschen.

Hämagglutination: Zur Serumverdünnungsreihe werden gleiche Teile der 1%igen Erythrozytensuspension gegeben. Das Gemisch kommt für 2 Std. ins Wasserbad von 37°C. Dann wird abgelesen.

i) Methode nach B r o d h a g e und F e y .

Antigene von *Bruc. abortus*. Aufbereitung einmal durch Zugabe von Phenol, zum anderen durch Erhitzen der Bakteriensuspension für 2 Std. auf 100°C.

Erythrozyten: Vom Hammel.

Sensibilisierung: Die gewaschenen und konzentrierten Erythrozyten werden im Verhältnis 1:50 mit der Antigenlösung gemischt und 2 Std. bei 37°C gehalten. Nach vorsichtigem Zentrifugieren wird dreimal mit physiol. NaCl-Lösung gewaschen und schließlich werden die Erythrozyten in 50 ml NaCl-Lösung resuspendiert.

Hämagglutination: Diese Erythrozytensuspension wird zur Serumverdünnungsreihe gegeben. Das Ganze wird 2 Std. lang bei 37°C belassen, aufgeschüttelt und über Nacht bei Zimmertemperatur gehalten; dann Ablesung.

k) Methode nach S i e b u r t h .

Antigene: Vogel-Salmonellen. 24 Std. alte Agarkulturen werden mit 25 ml physiol. NaCl-Lösung abgeschwemmt und 1 Std. lang auf 100°C erhitzt. Dann werden die Bakterientrümmer durch 2 Min. Zentrifugieren bei 1000 U./Min. entfernt.

Erythrozyten: Vom Huhn; es wird Citrat-Blut verwendet, das dreimal mit physiol. NaCl-Lösung gewaschen wird.

Sensibilisierung: Zu einer 0,5%igen Erythrozytensuspension wird der Zentrifugierüberstand in einer Verdünnung von 1:20 gegeben. Sensibilisierung im Wasserbad bei 37°C 45 Min. lang. Dann wird dreimal 2 Min. lang mit physiol. NaCl-Lösung bei 1500 U./Min. gewaschen.

Hämagglutination: Die sensibilisierte Erythrozytensuspension wird im Verhältnis 1:2 zur Serumverdünnungsreihe gegeben. Das Ablesen des Titers erfolgt nach 45 Min. Reaktionszeit bei Zimmertemperatur.

4. Methode des Tübinger Hygiene-Instituts

a) Antigene: Die jeweils verwendeten Bakterienstämme werden auf Schrägagarröhrchen 24 Std. lang bebrütet und mit je 2 ml physiol. NaCl-Lösung abgeschwemmt. Anschließend wird die Bakteriensuspension im Autoklaven 2 Std. lang bei 120°C abgetötet. Die Antigenlösung wird dann bei 4°C (Kühlschrank) gelagert.

b) Erythrozyten: Vom Hammel; Blut wird unter sterilen Bedingungen aus der Halsvene entnommen, dann wird mit Glasperlen defibriniert. Dieses Blut wird ohne Konservierungszusatz im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Es wird maximal 3 Tage lang zu den Hämagglutinationsversuchen benutzt. Bei vorherigem Auftreten von Hämolyse wird es verworfen. Das defibrinierte Blut wird vor Gebrauch dreimal mit physiol. NaCl-Lösung gewaschen.

- c) Seren: Die agglutinierenden Seren werden durch Immunisieren von Kaninchen mit entsprechenden Vakzinen hergestellt. Diese werden dazu mit 0,5% Phenol versetzt und 2 Std. lang bei 52°C gehalten. Die Vakzine wird in einer Serie von Injektionen mit ansteigender Dosis, in einem Zeitraum von 14, bzw. 20 Tagen appliziert, wobei jeweils im Abstand von drei Tagen geimpft wird. Die Tiere werden normalerweise vier Tage nach der letzten Injektion getötet und aus der Halsvene entblutet. Zur Konservierung wird dem Serum, ohne vorangegangene Inaktivierung, eine geringe Menge AgCl zugesetzt. Die Seren werden bei 4°C gelagert.
- d) Sensibilisierung: Die gewaschenen, abzentrifugierten Erythrozyten werden im Verhältnis 1:1000 mit physiol. NaCl-Lösung verdünnt, und dann im Verhältnis 64:1 mit der Antigenlösung vermischt. Nach kräftigem Durchschütteln wird das Erythrozyten-Antigen-Gemisch für 5 Min. ins 37°C-Wasserbad verbracht. Zur Entfernung des überschüssigen Antigens wird anschließend dreimal je 5 Min. lang bei 2000 U./Min. zentrifugiert, wobei der Überstand jedes Mal verworfen und wieder durch 5 ml physiol. NaCl-Lösung ersetzt wird. Nach dem dritten Waschvorgang wird mittels physiol. NaCl-Lösung die ursprüngliche Erythrozytenverdünnung von 1:1000 wiederhergestellt. Diese Suspension wird bei den Versuchen benutzt. Es wird eine Zentrifuge der Fa. Fr. Runne Nachf., Heidelberg-Rohrbach, mit einem Radius von 10 cm verwendet. Bei einer Tourenzahl von 3000/Min. ergibt sich damit eine Schleuderziffer von ca 1000. Diese Zahl wurde aus einem der Zentrifuge beigegebenen Nogramm entnommen. Sie errechnet sich aus dem Dividieren der Zentrifugalbeschleunigung b durch die Erdbeschleunigung g .
- e) Hämagglutination: Es werden für den Test normale WaR-Reagenzgläser, 100 x 11 mm, mit rundem Boden benützt. Die zu untersuchenden Seren werden in der üblichen geometrischen Reihe zur Basis 50 verdünnt und zu je 0,5 ml der aufeinanderfolgenden Serumverdünnungen wird die gleiche Menge der 0,1%igen sensibilisierten Erythrozy-

tensuspension gegeben. Außerdem ist ein Kontrollröhrchen mit reiner physiol. NaCl-Lösung der Verdünnungsreihe zugefügt. Die Röhrchen werden gut durchgeschüttelt und 5 Min. bei Zimmertemperatur belassen. Anschließend wird 5 Min. bei 2000 U./Min. zentrifugiert und dann sofort abgelesen.

Die Ablesung und Einstufung der Reaktionsergebnisse erfolgt mit bloßem Auge, indem jedes einzelne Röhrchen leicht mit dem Finger angetippt und das Verhalten der abzentrifugierten Erythrozyten beobachtet wird. Eine Verkürzung der Ablesung wird dadurch erreicht, daß zuvor eine grob orientierende Übersicht über alle in einem Gestell enthaltenen Röhrchen gewonnen wird, indem das Gestell einmal kurz geschüttelt und dann von unten gegen das Licht betrachtet wird. Es müssen dann nur noch die Röhrchen, welche um den Titerpunkt liegen einzeln, wie oben dargestellt, untersucht werden. Bei negativem Reaktionsausfall setzen sich die Erythrozyten scharf begrenzt auf dem Röhrchenboden ab. Bei leichtem Anklopfen lösen sie sich auf und verursachen eine intensive Trübung des Röhrcheninhaltes. Der positive Reaktionsausfall kann von verschiedenem Stärkegrad sein, dem durch die Bewertungsstufen 4+, 3+, 2+, 1+ Rechnung getragen wird.

Es bedeuten:

- 4+ : Die Erythrozyten bedecken als kompaktes Agglutinat in Form eines Häutchens, dessen Ränder leicht aufgebogen sind, den Röhrchenboden. Dieses Häutchen läßt sich durch leichtes Anschlagen des Röhrchens nicht zerteilen.
- 3+ : Der Zusammenhalt des Agglutinates ist etwas geringer; das Häutchen löst sich beim Anklopfen in einzelne Bruchstücke auf, die in der umgebenden Flüssigkeit flottieren.
- 2+ : Die Erythrozyten haben sich zu vielen kleinen Zellklumpen zusammengelagert, die beim Anschlagen durcheinanderwirbeln.

1+ : Die Agglutinate sind noch kleiner geworden und liegen an der Grenze der Sichtbarkeit.

Eine ⁺ - Bewertung erübrigt sich, da folgende klare Abgrenzung zwischen positivem und negativem Reaktionsausfall gegeben ist. Auch bei geringster, mit dem bloßen Auge eben noch wahrnehmbarer Agglutination trübt sich die Lösungsflüssigkeit bei Aufschütteln nicht ein, während dies bei negativem Ergebnis immer der Fall ist. Der Titer ist ausgedrückt als diejenige Verdünnung eines agglutinierenden Serums, die gerade noch eine eindeutig positive Reaktion ergibt.

II. Eigene Untersuchungen zur Methodik der indirekten Hämagglutination

1. Material:

a) Erythrozyten: Vom Hammel. Die Gewinnung und Aufbereitung erfolgte nach der oben dargelegten Methode des hiesigen Hygiene-Instituts.

b) Antigene: Von folgenden Stämmen des Tübinger Hygiene-Instituts gewonnen:

1) Stamm Max 51 - *Pseudomonas shigelloides* -

Das O-Antigen dieses Stammes ist identisch mit dem O-Antigen der Rundform von *Sh. sonnei* (B a d e r , 1954)

2) Stamm Nr. 84 (O-Antigene 3, 15) - *Salmonella newington* -

3) Stamm Nr. 91 (O-Antigene 13, 22) - *Salmonella poona* -

4) Stamm Nr. 95 (O-Antigen 16) - *Salmonella hvittingfoss* -

5) Stamm Nr. 97 (O-Antigen 17) - *Salmonella kirkee* -

6) Stamm Nr. 32 (Vi-Antigen, O-Antigen 6, 7) - *Salmonella paratyphi C* "East Africa" -

7) *Shigella flexneri*

8) *Brucella abortus*

Die Antigene wurden nach der auf Seite 19 beschriebenen Methode hergestellt.

c) Seren: Deren Gewinnung hielt sich ebenfalls an die im Tübinger Hygiene-Institut angewandte Methode (s.S. 20). Im einzelnen wurden die homologen Seren wie folgt gewonnen:

- 1) Serum T 3 (Agglutinine gegen Ps. shigelloides) durch Immunisieren der Kaninchen mit einer Gesamtvakzinemenge von 1,4 ml innerhalb von 14 Tagen, in drei ansteigenden Dosen.
- 2) Serum T 73 (O-Agglutinine 3, 15) mit einer Gesamtvakzinemenge von 1,7 ml innerhalb von 14 Tagen, in vier ansteigenden Injektionsdosen.
- 3) Serum T 74 (O-Agglutinine 13, 22) wie Serum T 73
- 4) Serum T 75 (O-Agglutinin 16) mit einer Gesamtvakzinemenge von 3,3 ml innerhalb von 20 Tagen, in sechs ansteigenden Dosen.
- 5) Serum T 76 (O-Agglutinin 17) wie Serum T 75.
- 6) Typhus-Vi-Serum, Robert-Koch-Institut, Nr. 1282
Ballerup-Vi-Serum, " " " , Nr. 151
- 7) Flexner-Polyvalent-Serum, " " , Nr. 1378
- 8) Brucella abortus-Serum, im hiesigen Institut hergestellt.

Anderweitig im Institut durchgeführte Untersuchungen zeigten, daß die Heteroagglutinintiter der benutzten Seren so niedrig lagen, daß sie vernachlässigt werden konnten. Insbesondere erwies sich aus diesem Grunde eine Absorption der Seren als nicht notwendig.

2. Methodik der Untersuchungen:

Ausgangspunkt für die eigenen Untersuchungen bildete die Methode des Tübinger Hygiene-Instituts. Darauf aufbauend sollen nun in chronologischer Reihenfolge die einzelnen Abschnitte der Fortentwicklung dargestellt werden. Dabei baut jede weitere Stufe auf den als optimal erkannten Ergebnissen der vorangehenden Stufen auf.

A. Zunächst wurden mit dem Stamm *Pseudomonas shigelloides* orientierende Voruntersuchungen durchgeführt. Es zeigte sich jedoch bei der Hämagglutination mit dem homologen Serum T 3 ein negativer Reaktionsausfall, während die gleichzeitig durchgeführte Widal-Kontrolle immerhin einen Serumtiter von 1:800 aufwies.

Es ergaben sich als Schlussfolgerung aus dieser Diskrepanz folgende Möglichkeiten:

- 1) ein technischer Fehler konnte vorliegen,
- 2) es konnte zu wenig sensibilisierendes Antigen zur Anwendung gekommen sein,
- 3) für die Antigene dieses Stammes fehlte die Adsorptionsmöglichkeit an die Erythrozytenoberfläche.

Nachdem das Vorliegen eines Fehlers in der Ausführung der Reaktion durch sorgfältige Überprüfung und Wiederholungsuntersuchungen ausgeschaltet war, wurde versucht, eine ausreichende Antigenadsorption zu erzielen. Zu diesem Zweck wurden die Kulturen nicht wie bisher mit 2 ml physiol. NaCl-Lösung von Schrägagarröhrchen, nach 24-stündiger Bebrütung bei 37°C abgeschwemmt, sondern mit je 3 ml physiol. NaCl-Lösung von Drigalskischalen-Kulturen nach 3 x 24-stündiger Bebrütung bei 37°C. Die Aufschwemmung enthielt damit wesentlich mehr Bakterien. Zusätzlich wurde das für die Sensibilisierung benutzte Mischungsverhältnis von Antigenextrakt zu Erythrozytensuspension von 1:100 auf 1:20 reduziert.

Es zeigte sich, daß für die Antigene von *Ps. shigelloides* eine gewisse Adsorptionsmöglichkeit an die Erythrozyten besteht. Durch die höhere Antigenkonzentration wurde eine Sensibilisierung erzielt, die sich jedoch bei Zugabe von homologem Serum nur durch niedrige Titer anzeigte. Eine Kongruenz mit den Ergebnissen der Widal-Kontrolle war jedoch nicht gegeben. Der vorliegende Stamm wurde wegen der aufgetretenen Schwierigkeiten für die weiteren Untersuchungen zur Methodik der indirekten Hämagglutination als ungeeignet betrachtet. Die mit diesem Stamm gemachten Erfahrungen bestätigten die im Rahmen anderer Untersuchungen erzielten Resultate, daß aus bisher noch unbekannten Gründen O-Antigene bestimmter Bakteriengruppen für die indirekte Hämagglutination wenig geeignet sind.

B. Für die folgenden Versuche wurden nun *S. newington*, Stamm Nr. 84 (O-Antigene 3, 15) und das homologe Serum T 73 (O-Agglutinine 3, 15) verwendet.

Bei gleichbleibenden übrigen Versuchsbedingungen wurde zunächst die *A n t i g e n a u f b e r e i t u n g* hinsichtlich der Abtötung der Kulturaufschwemmung variiert. Die Züchtung der Kulturen, 24 Std. in Schrägagarröhrchen bei 37°C und die Gewinnung durch Abschwemmen mit je 2 ml physiol. NaCl-Lösung, wurde nicht verändert. Die indirekte Hämagglutination wurde mit folgenden Varianten von Antigenextrakten angestellt.

- 1) Bakteriensuspension 2 Std. und 1 Std. auf 120°C erhitzt (Autoklav),
- 2) 2 Std. und 1 Std. auf 100°C erhitzt (Dampftopf),
- 3) 15 Min. und 5 Min. gekocht,
- 4) 22°C - Antigen.

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in Tabelle 1 wiedergegeben.

Die Ablesung der Reaktions**e**rg**e**bnisse und die Bewertung des Agglutinationsgrades erfolgte nach den auf Seite 21 dargestellten Maßstäben.

Wie aus Tabelle 1 hervorgeht, weisen die Versuchsreihen mit langfristig thermisch vorbehandelten Bakteriensuspensionen denselben Serumtiter auf, bei allerdings langsam abnehmender Agglutinationsstärke. Erst bei einer Extraktion während 15 Min. bei 100°C kommt es zu einem starken Titerabfall. Bei einer Erhitzungsdauer von 5 Min. bei 100°C und bei der Verwendung von 22°C-Antigenen konnten keine Titer mehr nachgewiesen werden.

Serum T 73 (3, 15)											
	50	100	200	400	800	1600	3200	6400	800 ¹²	600 ²⁵	NaCl
2 Std./120°	3	3	3	3	2	2	1	-	-	-	-
1 Std./120°	3	3	3	3	2	2	1	-	-	-	-
2 Std./100°	3	3	3	2	2	2	1	-	-	-	-
1 Std./100°	3	2	2	2	2	1	1	-	-	-	-
15Min./100°	2	2	1	1	1	-	-	-	-	-	-
5Min./100°	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22°	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tab. 1 S. newington, Stamm Nr. 84 (3, 15).

Hämagglutinationsergebnisse bei Variation der Antigen-aufbereitung. Die Zahlen geben die Stärke der Reaktion an.

Als Resultat dieser Versuchsserie konnte festgehalten werden, daß die Vorbehandlung der Kulturen bei 120°C und 1 Std. Dauer, hinsichtlich Arbeitsaufwand und Reaktionsausfall, optimal ist.

Ergänzende Untersuchungen hierzu ergaben, daß bei einer Temperatur von 120°C eine Verkürzung der Einwirkungszeit auf 1/2 Std. eine Reduzierung der Titer um mehrere Stufen bewirkt. Die Behandlungszeit von 1 Std. bei 120°C kann also - ohne Auswirkung auf die Hämagglutinationsreaktion - nicht unterschritten werden.

Es ergab sich damit folgende Entwicklungsstufe der Reaktion:

(1) Antigenaufbereitung: 1 Std./120°C

Erythrozytenverdünnung mit physiol. NaCl: 1:1000

Verhältnis ~Antigen zu Erythrozytenverdünnung: 1:64

Sensibilisierungszeit und -temperatur: 5 Min./37°C

Antigenauswaschen d. Zentrifugieren: 2000 U./3x 5 Min.

Hämagglutination: 5 Min./20°C.

Schlusszentrifugieren: 2000 U./5 Min.

Die hier verwendete stichwortartige Zusammenfassung wird im weiteren Verlauf der Arbeit jeweils zur Fixierung der einzelnen Stufen bei der Entwicklung der Methodik benutzt. Der jeweils variierte Arbeitsgang ist dabei unterstrichen. Die zum Vergleich herangezogene d i r e k t e B a k t e r i e n a g g l u t i n a t i o n (G r u b e r) wies einen Reaktionsanstieg in umgekehrter Richtung auf, mit dem Maximum bei Verwendung von 22°C-Antigen. Siehe dazu Tabelle 1 a.

Serum T 73 (3, 15)										
	50	100	200	400	800	1600	3200	6400	¹² 800	²⁵ 600 NaCl
2 Std./120°	1	(1)	(1)	-	-	-	-	-	-	-
1 Std./120°	1	1	(1)	-	-	-	-	-	-	-
2 Std./100°	3	1	1	1	-	-	-	-	-	-
1 Std./100°	3	<u>2</u>	<u>2</u>	1	-	-	-	-	-	-
15Min./100°	3	3	2	1	-	-	-	-	-	-
5 Min./100°	3	3	2	1	-	-	-	-	-	-
22°	3	3	3	1	-	-	-	-	-	-

Tab. 1 a Vergleichende Untersuchung von *S. newington* mit der Gruber - Reaktion.

Es stellte sich dabei außerdem heraus, daß die indirekte Hämagglutination empfindlicher ist als die direkte Bakterienagglutination. Die erreichten Titer lagen durchschnittlich um zwei bis drei Stufen höher.

Die nächste Untersuchungsstufe betraf die gleichzeitig gegeneinander erfolgende Variation von E r y t h r o z y t e n v e r d ü n n u n g , Z e n t r i f u g i e r d a u e r und Z e n t r i f u g i e r g e s c h w i n d i g k e i t. Dabei wurden die Daten für das Auswaschen des Antigenüberschusses und für das abschließende Zentrifugieren zur Er-

zielung der Hämagglutination je Versuchsreihe gleichsinnig verändert. Es wurde außerdem eine Versuchsreihe angeschlossen, in der das überschüssige Antigen nach der Sensibilisierung der Erythrozyten nicht ausgewaschen wurde.

Folgende Versuchsanordnung wurde gewählt:

- 1) Erythrozytenverdünnung mit physiol. NaCl-Lösung von 1 : 200, kombiniert mit Zentrifugiergeschwindigkeit/ Zentrifugierdauer von 2000 U./2 Min., 2000 U./4 Min., 3000 U./2Min., 3000 U./4 Min.;
- 2) Erythrozytenverdünnung von 1 : 1000, mit denselben Zentrifugierkombinationen und ohne Zentrifugieren
- 3) Erythrozytenverdünnung von 1 : 2000, mit denselben Zentrifugierkombinationen.

Die Versuchsergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Es ließen sich aus dieser Versuchsreihe folgende Schlussfolgerungen ziehen:

1. Eine Erythrozytenaufschwemmung mit physiol. NaCl-Lösung im Verhältnis 1 : 200 erwies sich als zu konzentriert, wodurch die Festlegung des Serumtiters erschwert wird. Es finden sich nämlich bei höheren Titerstufen in steigendem Maße nicht in die Agglutination miteinbezogene Erythrozyten in der Lösungsflüssigkeit. Durch die entstehende Trübung wird das Ablesen erschwert oder sogar unmöglich gemacht. Durch das Mißverhältnis zwischen der Menge der zur Reaktion angebotenen Erythrozyten und derjenigen des Antigens scheint die Sensibilisierung unvollständig geblieben zu sein.
2. Eine Verdünnung der Erythrozyten von 1 : 2000 erwies sich als zu hoch, da hierbei die Schwierigkeit auftritt, daß in den letzten Titerstufen nicht mehr eindeutig zwischen positivem und negativem Reaktionsausfall unterschieden werden kann.
3. Die Verdünnung der Erythrozyten von 1 : 1000 erwies sich in der vorliegenden Serie von Versuchen als optimal. Diese Verdünnung gewährleistet eine eindeutige Ablesung der Titer.

Serum T 73 (3, 15)											
	50	100	200	400	800	1600	3200	6400	800 ¹²	600 ²⁵	NaCl
1 : 200 2000 U./2Min.	4	3	3	3	2	1	1	-	-	-	-
1 : 200 2000 U./4Min.	4	4	3	3	2	2	1	-	-	-	-
1 : 200 3000 U./2Min.	4	4	4	3	3	2	1	1	-	-	-
1 : 200 3000 U./4Min.	4	4	4	3	3	1	1	1	-	-	-
1 : 1000 2000 U./2 Min.	4	4	4	3	2	2	1	-	-	-	-
1 : 1000 2000 U./4Min.	4	4	4	4	3	2	1	-	-	-	-
1 : 1000 3000 U./2Min.	4	4	4	4	3	3	2	-	-	-	-
1 : 1000 3000 U./4Min.	4	4	4	4	4	3	1	-	-	-	-
2000 2000 U./2Min.	3	3	3	3	2	1	(1)	-	-	-	-
1 : 2000 2000 U./4Min.	3	3	3	3	2	2	(1)	-	-	-	-
1 : 2000 3000 U./2Min.	4	3	3	2	2	1	(1)	-	-	-	-
1 : 2000 3000 U./4Min.	4	3	3	3	2	2	(1)	-	-	-	-
1 : 1000 ohne Zentr.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tab. 2 S. newington, Stamm Nr. 84 (3, 15).

Hämagglutinationsergebnisse bei Variation der Erythrozytenverdünnung, der Zentrifugiergeschwindigkeit und der Zentrifugierdauer.

4. Bei sämtlichen Verdünnungsvariationen läßt sich ein Empfindlichkeitsanstieg der Reaktion mit der Erhöhung der Zentrifugiergeschwindigkeit und der Zentrifugierdauer beobachten. Eine Zentrifugiergeschwindigkeit von 2000 U./Min. liefert zwar größtenteils dieselben Endtiter, jedoch ist die Reaktionsintensität in den einzelnen Stufen bei einer Zentrifugiergeschwindigkeit von 3000 U./Min. größer. Der Gewinn durch Erhöhung der Zentrifugierdauer ist nicht relevant und kann daher vernachlässigt werden.

Die optimale Kombination aus dieser Versuchsreihe lautet demnach folgendermaßen:

Erythrozytenverdünnung 1 : 1000; Zentrifugiergeschwindigkeit 3000 U./Min.; Zentrifugierdauer 2 Min., gerechnet ab Erreichen der vollen Tourenzahl.

Zwei Fragen sind in diesem Untersuchungsabschnitt auftaucht, die noch der Klärung bedurften:

- 1) Kann bei einer Erythrozytenverdünnung von 1 : 200 durch eine Erhöhung der Antigenkonzentration bei der Sensibilisierung eine größere Antigenmenge an die Erythrozyten angelagert und damit eine einwandfreie Ablesung des Agglutinationsergebnisses erreicht werden?
- 2) Kann durch eine weitere Erhöhung der Zentrifugiergeschwindigkeit eine Verbesserung des Reaktionsausfalles erzielt werden?

Zur Klärung der ersten Frage wurde an Stelle eines Antigen-Erythrozyten-Mischungsverhältnisses von 1 : 64 mit einem solchen von 1 : 15, bzw. 1 : 30 gearbeitet. Es zeigte sich dabei, daß beim Ablesen der Röhrchen in den letzten positiven Stufen keine Trübung durch nichtreagierende Erythrozyten mehr auftrat. Durch die Verbesserung der Sensibilisierung war die Reaktion einwandfrei ablesbar. Auf die Titerhöhe bezogen erwies sich das Mischungsverhältnis von 1 : 30 als vorteilhafter. Bei 1 : 15-Mischung scheint zuviel überschüssiges Antigen im Reaktionsgemisch zu verbleiben, wodurch Serumantikörper abgebunden werden.

Da mit dieser Modifikation der Methode keine höhere Empfindlichkeit erreicht wird, der Materialaufwand jedoch größer ist, wurde in den folgenden Untersuchungen mit einer Erythrozytenverdünnung von 1 : 1000 gearbeitet.

Eine Erhöhung der Zentrifugiergeschwindigkeit auf 4000 U./Min. brachte keinerlei Verbesserung gegenüber einer Tourenzahl von 3000 U./Min..

Nach Klärung dieser Fragen ergab sich folgende neue Entwicklungsstufe der Methode:

(2) Antigenaufbereitung: 1 Std./120°C

Erythrozytenverdünnung mit physiol. NaCl: 1:1000

Verhältnis Antigen zu Erythrozytenverdünnung: 1:64

Sensibilisierungszeit und -temperatur: 5 Min./37°C

Antigenauswaschen d. Zentrifugieren: 3000 U./3x2 Min.

Hämagglutination: 5 Min./20°C

Schlusszentrifugieren: 3000 U./2 Min.

Von diesen Daten ausgehend wurden als Nächstes die optimale S e n s i b i l i s i e r u n g s z e i t und - t e m p e r a t u r gesucht.

Zu diesem Zweck wurden die Temperaturen 4°C, 20°C, 30°C, 37°C, 42°C, 45°C und 52°C gegen die Zeiten 0,5 Min., 2,5 Min., 5 Min., 10 Min., 30 Min., 45 Min. und 60 Min. variiert. Für die Temperaturen 42°C und 45°C wurde außerdem noch eine Sensibilisierungszeit von 20 Min. hinzugenommen.

Die Versuchsergebnisse sind in Tab. 3 enthalten. Daraus ergibt sich folgendes:

- 1) Die Hämagglutinationstiter erfahren bei Temperaturen zwischen 20°C und 37°C mit steigender Sensibilisierungstemperatur und -dauer eine Steigerung. Gleichzeitig nimmt auch die Intensität der Reaktion zu.

Diese Regel gilt nicht bei einer Versuchstemperatur von 4°C. Bei Versuchstemperaturen von 42°C an aufwärts ist eine Aussage nicht möglich, da die nun bei längeren Inkubationszeiten einsetzende Zerstörung der Erythrozyten durch Hämolysen einer weiteren Reaktionssteigerung zuwiderläuft. Wie aus der Tabelle zu entnehmen ist, setzt

Serum T 73 (3, 15)

		12 25										
		50	100	200	400	800	1600	3200	6400	800	600	NaCl
x	4°C/0,5	Min.	3	3	3	2	1	-	-	-	-	-
	4°C/2,5	Min.	3	3	3	2	1	-	-	-	-	-
	4°C/ 5	Min.	3	3	3	2	1	1	-	-	-	-
	4°C/10	Min.	3	3	3	2	2	1	-	-	-	-
	4°C/30	Min.	3	3	3	3	2	1	-	-	-	-
	4°C/45	Min.	3	3	3	2	✓	-	-	-	-	-
	4°C/60	Min.	3	3	3	2	-	-	-	-	-	-
	20°C/0,5	Min.	3	3	3	2	1	-	-	-	-	-
	20°C/2,5	Min.	3	3	3	2	2	-	-	-	-	-
	20°C/ 5	Min.	3	3	3	3	2	1	-	-	-	-
x	20°C/10	Min.	3	3	3	3	2	1	-	-	-	-
	20°C/30	Min.	3	3	3	3	3	2	1	-	-	-
	20°C/45	Min.	4	4	4	3	3	2	-	-	-	-
	20°C/60	Min.	4	4	4	4	3	3	1	-	-	-
	30°C/0,5	Min.	3	3	3	2	2	-	-	-	-	-
	30°C/2,5	Min.	3	3	3	3	3	2	-	-	-	-
	30°C/ 5	Min.	3	3	3	3	3	2	1	-	-	-
	30°C/10	Min.	4	4	3	3	3	3	2	-	-	-
	30°C/30	Min.	4	4	4	4	3	3	3	-	-	-
	30°C/45	Min.	4	4	4	4	4	3	3	2	-	-
x	30°C/60	Min.	4	4	4	4	4	4	3	2	-	-
	37°C/0,5	Min.	4	4	4	3	3	3	-	-	-	-
	37°C/2,5	Min.	4	4	4	4	4	3	-	-	-	-
	37°C/ 5	Min.	4	4	4	4	4	3	3	-	-	-
	37°C/10	Min.	4	4	4	4	4	4	3	-	-	-
	37°C/30	Min.	4	4	4	4	4	3	3	2	-	-
	37°C/45	Min.	4	4	4	4	4	4	3	2	-	-
	37°C/60	Min.	4	4	4	4	4	4	3	2	-	-

Tab. 3 S. newington, Stamm Nr. 84 (3, 15). Hämagglutinations-
 ergebnisse bei Variation der Sensibilisierungstemperatur
 und -zeit

Serum T 73 (3, 15)													
		50	100	200	400	800	1600	3200	6400	12 25	800	600	NaCl
	42°C/0,5	Min.	4	4	4	3	3	2	-	-	-	-	-
	42°C/2,5	Min.	4	4	4	3	3	3	-	-	-	-	-
	42°C/ 5	Min.	4	4	4	3	3	3	-	-	-	-	-
	42°C/10	Min.	4	4	4	4	3	3	3	-	-	-	-
	42°C/20	Min.	4	4	4	4	4	3	1	-	-	-	-
x	42°C/30	Min.	4	4	4	4	4	3	3	2	-	-	-
	42°C/45	Min.	4	4	4	4	3	3	2	-	-	-	-
	42°C/60	Min.	4	4	4	3	3	3	2	1	-	-	-
	===== beginnende Hämolyse =====												
	45°C/0,5	Min.	4	3	3	3	2	1	-	-	-	-	-
	45°C/2,5	Min.	4	4	3	3	3	1	-	-	-	-	-
	45°C/ 5	Min.	4	4	4	4	3	3	-	-	-	-	-
	45°C/10	Min.	4	4	4	4	3	2	1	-	-	-	-
	===== beginnende Hämolyse =====												
x	45°C/20	Min.	4	4	4	4	3	3	2	-	-	-	-
	45°C/30	Min.	-	-	vollständige Hämolyse						-	-	-
	=====												
	52°C/0,5	Min.	4	4	3	3	3	2	-	-	-	-	-
x	52°C/2,5	Min.	4	4	4	3	3	3	2	-	-	-	-
	52°C/ 5	Min.	4	4	3	3	3	3	2	-	-	-	-
	===== beginnende Hämolyse =====												
	52°C/10	Min.	3	3	2	2	2	1	1	-	-	-	-
	52°C/30	Min.	-	-	vollständige Hämolyse						-	-	-

Tab. 3 (Fortsetzung). Die mit x markierten Werte der Temperatur-Zeit-Kombinationen mit den zugehörigen Titern finden in Abb. 1 Verwendung.

die Hämolyse bei Inkubation im 42°C-Wasserbad nach 60 Min., bei 45°C aber bereits nach 10 Min. und bei 52°C nach 5 Min. ein. Das Ablesen der Reaktion ist dadurch erschwert, Schließlich liegt dann bei 45°C und 52°C nach einer Inkubation von 30 Min. eine komplette Hämolyse vor.

- 2) Die Auswertung der gefundenen Daten unter dem Gesichtspunkt der optimalen Sensibilisierungszeit und -temperatur-Kombination erfolgte unter Berücksichtigung der Rationalisierungsbestrebungen für die Laborpraxis. Es galt also höchstmögliche Empfindlichkeit der Reaktion bei geringstmöglichem Zeitaufwand zu wählen. Diese Bedingungen werden von der Kombination 37°C/30 Min. erfüllt. Eine Verlängerung der Inkubationszeit bringt bei dieser Temperatur lediglich eine Intensitätssteigerung, jedoch keine weitere Titererhöhung mit sich.
- 3) Die noch in Betracht kommende Sensibilisierungstemperatur von 42°C bringt zwar eine geringe zeitliche Einsparung, schließt aber unter ungünstigen Bedingungen die Gefahr der Hämolyse ein. Außerdem hat sie gegenüber der Temperatur von 37°C den Nachteil, daß im Laborbetrieb ein Wasserbad dieser Temperatur keine regelmäßige Verwendung findet. Somit kann die Kombination von 37°C/30 Min. als für das praktische Arbeiten optimal gelten.

Die Entwicklung der Methodik stellt sich danach wie folgt dar:

- (3) Antigenaufbereitung: 1 Std./120°C
Erythrozytenverdünnung mit physiol. NaCl: 1:1000
Verhältnis Antigen zu Erythrozytenverdünnung: 1:64
Sensibilisierungszeit und -temperatur: 30 Min./37°C
Antigenauswaschen d. Zentrifugieren: 3000 U./3y2 Min.
Hämagglutination: 5 Min./20°C
Schlusszentrifugieren: 3000 U./2 Min.

Unternimmt man es, unabhängig von praktischen Erwägungen, die in der Tabelle 3 aufgezeichneten Versuchsergebnisse im Hinblick auf die jeweiligen Reaktionsoptima der einzelnen Untersuchungsreihen in einem Koordinatensystem zueinander in Beziehung zu bringen, so resultiert für die erzielten

Titer in Abhängigkeit von Sensibilisierungstemperatur und -zeit die in Abb. 1 wiedergegebene Kurve.

Als optimal erweisen sich im einzelnen folgende Kombinationen:

- 4°C/30 Min., Titer 1:1600
- 20°C/60 Min., Titer 1:3200
- 30°C/60 Min., Titer 1:6400
- 37°C/45 Min., Titer 1:6400
- 42°C/30 Min., Titer 1:6400
- 45°C/20 Min., Titer 1:3200
- 52°C/2,5 Min., Titer 1:3200

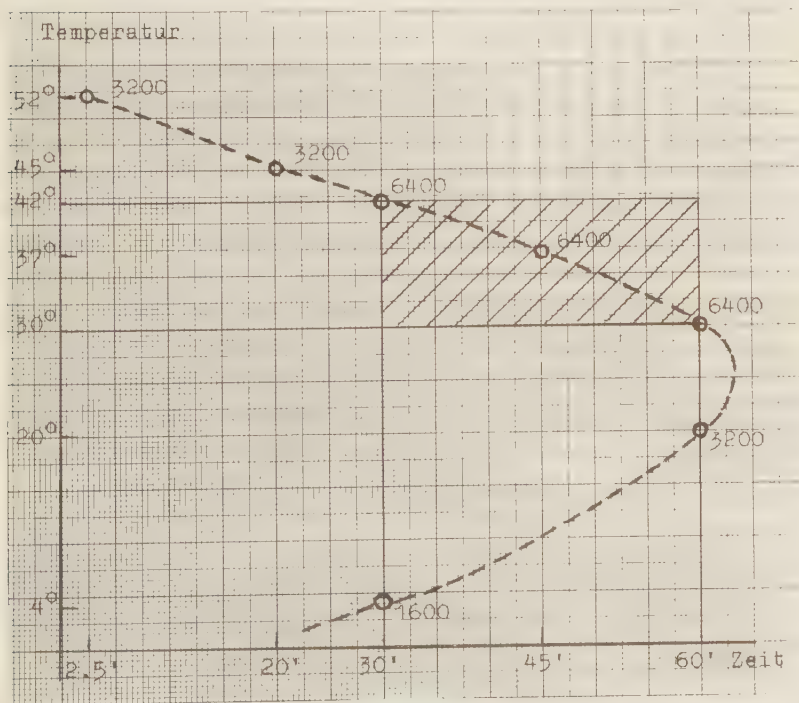


Abb. 1 Graphische Darstellung der Reaktionsoptima in Relation von Temperatur und Zeit. Vgl. hierzu Tab. 3.

An Hand der ermittelten Optimaldaten ließ sich eine Kurve konstruieren, die weitgehend einer Parabel gleicht. Die Darstellung vermittelt folgende Aufschlüsse:

- 1) Die Zunahme und Abnahme der Titerwerte mit steigender Sensibilisierungstemperatur geht auf der Kurve kontinuierlich von statten. Dies kommt darin zum Ausdruck, daß die niederen Werte auf den Schenkeln, die Maximalwerte nahe dem Scheitel der Kurve liegen.
- 2) Fällt man aus den beiden sich auf der Kurve am entferntesten gelegenen Titer-Maximalwerten (1:6400 bei 42°C/30 Min. und bei 30°C /60 Min.) Senkrechte auf Abszisse und Ordinate, so ist dadurch zum einen der für höchste Titer in Frage kommende Temperaturbereich, zum anderen der dafür in Frage kommende zeitliche Bereich abgegrenzt. Optimale Ergebnisse bezüglich der Titerhöhe sind somit zwischen 30°C bis 42°C einerseits und 30 Min. bis 60 Min. andererseits zu erwarten. Für die zeichnerische Darstellung und die daraus gezogenen Folgerungen gelten die Einschränkungen, die sich aus den bei biologischen Reaktionen zu erwartenden Abweichungen und aus der infolge der relativ geringen Zahl der in den Versuchen ermittelten Werte bedingten Unvollständigkeit ergeben.

Daran schlossen sich Versuche zur Ermittlung des Optimums an Temperatur und Zeit für die Koppelung der Antikörper an die antigensensibilisierten Erythrozyten an, also der eigentlichen H ä m a g g l u t i n a t i o n .

Analog der optimalen Temperatur für die Sensibilisierung wurde mit 37°C gearbeitet und eine Zeitvariation von 2,5 Min. bis 30 Min. vorgenommen. Nach der Entnahme aus dem Wasserbad wurde sofort zentrifugiert.

Die Versuchsergebnisse sind Tabelle 4 zu entnehmen. Wie daraus hervorgeht, trat durch den Übergang von Zimmertemperatur auf das 37°C - Wasserbad eine weitere graduelle Steigerung im Reaktionsablauf ein. Am Serum-enttiter änderte sich allerdings gegenüber den zuletzt durchgeführten Untersuchungen nichts, wie der Kontrollversuch mit der Kombination 20°C/5 Minuten zeigte. Da

Serum T 73 (3, 15)											
	50	100	200	400	800	1600	3200	6400	12800	25600	NaCl
37°C/2,5 Min.	4	4	4	4	4	4	3	2	-	-	-
37°C/ 5 Min.	4	4	4	4	4	4	4	3	-	-	-
37°C/ 10 Min.	4	4	4	4	4	4	3	1	-	-	-
37°C/ 30 Min.	4	4	4	4	4	4	4	3	-	-	-
20°C/ 5 Min.	4	4	4	4	4	3	3	2	-	-	-

Tab. 4 S. newington, Stamm Nr. 84 (3, 15). Hämagglutinationsergebnisse bei Variation der Hämagglutinationstemperatur und -zeit.

jedoch durch die höhere Temperatur eine Aktivierung des Agglutinationsvorganges und damit ein massiver Reaktionsausfall auch in den letzten positiven Röhrchen bewirkt wird, wurde die Ablesung dadurch erleichtert. Eine Inkubation von 5 Min. lieferte bereits optimale Ergebnisse. Somit wurde die Methode dahingehend abgewandelt und lautet nun folgendermaßen:

(4) Antigenaufbereitung: 1 Stä./120°C

Erythrozytenverdünnung mit physiol. NaCl: 1:1000

Verhältnis Antigen zu Erythrozytenverdünnung: 1:64

Sensibilisierungszeit und -temperatur: 30 Min./37°C

Antigenauswaschen d. Zentrifugieren: 3000 U./3x2 Min.

Hämagglutination: 5 Min./37°C

Schlusszentrifugieren: 3000 U./2 Min.

Nun galt es, als letzten Teilabschnitt der Methode, das Mischungsverhältnis von Antigenlösung zu Erythrozytensuspension zu variieren. Da es von der Höhe des Antigenüberschusses nach Abschluss der Erythrozytensensibilisierung abhängt, wie oft die Erythrozyten mit physiol. NaCl-Lösung gewaschen werden müssen, wurde im gleichen Arbeitsgang zusätzlich auch noch die Anzahl der Zentrifugievorgänge verändert.

Die Versuche wurden nach folgendem Schema ausgeführt:
Antigen - Erythrozyten - Gemische einer Verdünnung von
1:15, 1:30, 1:64, 1:100 und 1:200 wurden nach Ablauf der
Sensibilisierungszeit je einmal, zweimal und dreimal mit
physiol. NaCl-Lösung gewaschen. Mit diesen verschiedenen
Ausgangsmaterialien wurden dann die Hämagglutinationsver-
suche nach dem Schema 4 durchgeführt. Tabelle 5 enthält
die Ergebnisse.

Serum T 73 (3, 15)											
	50	100	200	400	800	1600	3200	6400	12800	25600	NaCl
1: 15/1 x	4	4	4	4	3	3	-	-	-	-	-
1: 15/2 x	4	4	4	4	4	4	4	-	-	-	-
1: 15/3 x	4	4	4	4	4	4	4	2	-	-	-
1: 30/1 x	4	4	4	4	3	3	2	-	-	-	-
1: 30/2 x	4	4	4	4	4	4	3	-	-	-	-
1: 30/3 x	4	4	4	4	4	4	4	3	-	-	-
1: 64/1 x	4	4	4	4	3	3	3	-	-	-	-
1: 64/2 x	4	4	4	4	4	4	3	-	-	-	-
1: 64/3 x	4	4	4	4	4	4	4	2	-	-	-
1:100/1 x	4	4	4	4	4	4	3	2	-	-	-
1:100/2 x	4	4	4	4	4	4	4	4	-	-	-
1:100/3 x	4	4	4	4	4	4	4	4	-	-	-
1:200/1 x	4	4	4	4	4	4	3	-	-	-	-
1:200/2 x	4	4	4	4	4	4	4	2	-	-	-
1:200/3 x	4	4	4	4	4	4	4	1	-	-	-

Tab. 5 S. newington, Stamm Nr. 84 (3, 15). Hämagglutinations-
ergebnisse bei Variation des Mischungsverhältnisses von
Antigenlösung/Erythrozytensuspension und der Anzahl der
Zentrifugierarbeitgänge.

Aus dieser Versuchsreihe ließ sich folgendes ableiten:

- 1) Die Empfindlichkeit der Reaktion wird fast durchweg proportional der Zahl der Waschvorgänge gesteigert.
- 2) Je höher die Antigenkonzentration im Verhältnis zur Erythrozytenkonzentration ist, desto öfter muss zentrifugiert werden, um eine empfindliche Methode zu bekommen.
- 3) Das Antigen-Erythrozyten-Mischungsverhältnis 1:100 gestattet es, bereits mit zweimaligem Waschen die höchstmögliche Titerstufe zu erreichen, wobei der Reaktionsausfall auch im letzten Röhrchen noch sehr massiv ist (4 +).

Damit hatte die Methode folgende Entwicklungsstufe erreicht:

(5) Antigenaufbereitung: 1 Std./120°C

Erythrozytenverdünnung mit physiol. NaCl: 1:1000

Verhältnis Antigen zu Erythrozytenverdünnung: 1:100

Sensibilisierungszeit und -temperatur: 30 Min./37°C

Antigenauswaschen d. Zentrifugieren: 3000 U./2x2 Min.

Hämagglutination: 5 Min./37°C

Schlusszentrifugieren: 3000 U./2 Min.

Unter Einbeziehung dieser neu dazugewonnenen Erkenntnisse wurde abschließend der Ablauf der Hämagglutinationsreaktion bei 20°C und bei 37°C vergleichend untersucht. Als Versuchsdauer wurden jeweils 5 Min., 10 Min. und 30 Min. gewählt.

Außer dieser nochmaligen Variation der Hämagglutinations-temperatur und -zeit, wurde in dieser Versuchsreihe auch eine vier Wochen alte, bei -20°C gelagerte Antigenlösung getestet. Die zu den bisherigen Versuchen benutzten Antigenlösungen waren stets aus frischen Kulturen gewonnen worden, bzw. maximal drei Tage lang bei 4°C gelagert worden.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 6 enthalten.

Die Auswertung dieser Ergebnisse brachte folgendes:

- 1) Für die Höhe des Seruntiters ist die Dauer der Reaktion maßgebend; je länger diese ist, desto höhere Titer erscheinen.
- 2) Eine Steigerung der Versuchstemperatur bewirkte demgegenüber ein Deutlicherwerden der Reaktion, mit stärkstmöglicher Agglutination auch in den letzten positiven Röhrchen der Verdünnungsreihe.

Aus den genannten Gründen erwies sich die Kombination von 37°C und 30 Min. als optimal für den Ablauf der Reaktion.

- 3) Das vier Wochen lang bei -20°C gelagerte Antigen zeigte sich in seiner Sensibilisierungsqualität praktisch unverändert.

Serum T 73 (3, 15)											
	50	100	200	400	800	1600	3200	6400	12	25	NaCl
20°C/ 5 Min.	4	4	4	4	4	4	3	2	-	-	-
20°C/10 Min.	4	4	4	4	4	4	3	3	1	-	-
20°C/30 Min.	4	4	4	4	4	4	3	3	1	-	-
37°C/ 5 Min.	4	4	4	4	4	4	3	2	-	-	-
37°C/10 Min.	4	4	4	4	4	4	4	3	1	-	-
37°C/30 Min.	4	4	4	4	4	4	4	4	2	-	-
A.: -20°C											
20°C/ 5 Min.	4	4	4	4	4	4	3	1	-	-	-
A.: -20°C											
37°C/ 5 Min.	4	4	4	4	4	4	4	3	-	-	-

Tab. 6 S. newington, Stamm Nr. 84 (3, 15). Hämagglutinationsergebnisse bei nochmaliger Variation der Hämagglutinationstemperatur und -dauer.

Damit war für S. newington, Stamm Nr. 84 (3, 15), eine optimale Methode der indirekten Hämagglutination mit dem homologen Serum T 73 (3, 15) entwickelt. Sie sah endgültig folgendermaßen aus:

- 1) A n t i g e n e , E r y t h r o z y t e n u n d S e -
r e n werden nach der bisherigen Methode des Tübinger
Hygiene-Instituts gewonnen, aufbereitet und gelagert.
Lediglich die Abtötung der Bakteriensuspension wurde
abgeändert. Sie erfolgt nun bei 120°C und dauert 1 Std.
- 2) S e n s i b i l i s i e r u n g : Die dreimal mit phy-
siol. NaCl-Lösung gewaschenen, zentrifugierten Erythro-
zyten werden im Verhältnis 1 : 1000 mit NaCl-Lösung
verdünnt und anschließend im Verhältnis 100 : 1 mit der
Antigenlösung gemischt. Dann kommt der Ansatz für eine
Dauer von 30 Min. ins 37°C-Wasserbad und anschließend
wird zur Entfernung des in dem Gemisch enthaltenen über-
schüssigen Antigens zweimal bei 3000 U./Min. je 2 Min.
lang mit physiol. NaCl-Lösung ausgewaschen.
- 3) H ä m a g g l u t i n a t i o n : Zu je 0,5 ml des zu
untersuchenden Serums wird die gleiche Menge der 0,1%
igen, sensibilisierten Erythrozytensuspension gegeben.
Nach gründlichem Mischen erfolgt für eine Dauer von 30
Min. eine Inkubation bei 37°C. Danach wird sofort 2 Min.
lang bei 3000 U./Min. zentrifugiert. Die Technik der
Ablesung wurde oben ausführlich beschrieben.

Auf die bisher benutzte kurze Formel gebracht, lautet
die optimale Methode folgendermaßen:

- (6) Antigenaufbereitung: 1 Std./120°C
Erythrozytenverdünnung mit physiol. NaCl: 1:1000
Verhältnis Antigen zu Erythrozytenverdünnung: 1:100
Sensibilisierungszeit und-temperatur: 30 Min./37°C
Antigenauswaschen d. Zentrifugieren: 3000 U./2 x 2 Min.
Hämagglutination: 30 Min./37°C
Schlusszentrifugieren: 3000 U./2 Min.

C. Ü b e r p r ü f u n g der Versuchsergebnisse mit mehreren anderen Bakterienstämmen.

Dazu wurde folgendes Material verwendet:

- 1) S. p o o n a , Laborstamm Nr. 91 (13, 22), mit dem homologen Serum T 74 (13, 22).
- 2) S. h v i t t i n g f o s s , Stamm Nr. 95 (16), mit dem Serum T 75 (16).
- 3) S. k i r k e e , Stamm Nr. 97 (17), mit dem Serum T 76 (17).
- 4) S. p a r a t y p h i C, "East Africa", Stamm Nr. 32 (Vi, 6, 7), mit den Seren Typhus-Vi, R. Koch-Institut, Nr. 1282 und Ballerup-Vi, R. Koch-Institut, Nr. 151.
- 5) S h . F l e x n e r i , mit dem Flexner-Polyvalentserum, R. Koch-Institut, Nr. 1378.
- 6) B. a b o r t u s , mit homologem Patientenserum des Tübinger Hygiene-Instituts.

Gleichzeitig wurden mit S. n e w i n g t o n , Stamm Nr. 84 (3, 15) und dem Serum T 73 (3, 15) die erforderlichen Kontrollversuche durchgeführt.

Die aufgeführten Bakterienarten wurden in gleichlaufenden Untersuchungsreihen mit den zuvor schrittweise entwickelten Modifikationen der Hämagglutinationsmethodik untersucht.

Die einzelnen zur Untersuchung herangezogenen Modifikationen seien hier nochmal der Deutlichkeit halber aufgeführt:

(1) Antigenaufbereitung: 1 Std./120°C

Erythrozytenverdünnung mit physiol. NaCl: 1:1000

Verhältnis Antigen zu Erythrozytenverdünnung 1:64

Sensibilisierungszeit und -temperatur: 5 Min./37°C

Antigenauswaschen d. Zentrifugieren: 2000 U./3 x 5 Min.

Hämagglutination: 5 Min./ 20°C

Schlusszentrifugieren: 2000 U./5 Min.

Diese Modifikation ist - mit Ausnahme der Antigenaufbereitung - identisch mit der Methode des Tübinger Hygiene-Instituts.

- (2) Antigenaufbereitung: 1 Std./120°C
Erythrozytenverdünnung mit physiol. NaCl: 1:1000
Verhältnis Antigen zu Erythrozytenverdünnung: 1:64
Sensibilisierungszeit und -temperatur: 5 Min./37°C
Antigenauswaschen d.Zentrifugieren: 3000 U./3 x 2 Min.
Hämagglutination: 5 Min./20°C
Schlusszentrifugieren: 3000 U./ 2 Min.
- (3) Antigenaufbereitung: 1 Std./120°C
Erythrozytenverdünnung mit physiol. NaCl: 1:1000
Verhältnis Antigen zu Erythrozytenverdünnung: 1:64
Sensibilisierungszeit und -temperatur: 30 Min./37°C
Antigenauswaschen d.Zentrifugieren: 3000 U./3 x 2 Min.
Hämagglutination: 5 Min./20°C
Schlusszentrifugieren: 3000 U./2 Min.
- (4) Antigenaufbereitung: 1 Std./120°C
Erythrozytenverdünnung mit physiol. NaCl: 1:1000
Verhältnis Antigen zu Erythrozytenverdünnung: 1:64
Sensibilisierungszeit und -temperatur: 30 Min./37°C
Antigenauswaschen d.Zentrifugieren: 3000 U./3 x 2 Min.
Hämagglutination: 5 Min./37°C
Schlusszentrifugieren: 3000 U./2 Min.
- (5) Antigenaufbereitung: 1 Std./120°C
Erythrozytenverdünnung mit physiol. NaCl: 1:1000
Verhältnis Antigen zu Erythrozytenverdünnung: 1:100
Sensibilisierungszeit und -temperatur: 30 Min./37°C
Antigenauswaschen d.Zentrifugieren: 3000 U./2 x 2 Min.
Hämagglutination: 5 Min./37°C
Schlusszentrifugieren: 3000 U./2 Min.
- (6) Antigenaufbereitung: 1 Std./120°C
Erythrozytenverdünnung mit physiol. NaCl: 1:1000
Verhältnis Antigen zu Erythrozytenverdünnung: 1:100
Sensibilisierungszeit und -temperatur: 30 Min./37°C
Antigenauswaschen d.Zentrifugieren: 3000 U./2 x 2 Min.
Hämagglutination: 30 Min./37°C
Schlusszentrifugieren: 3000 U./2 Min.

Diese Modifikation brachte bei den Untersuchungen mit S.
newington optimale Ergebnisse.

Die für die Kontrolluntersuchungen benutzten Antigene waren durchweg vier Wochen lang bei 4°C gelagert.

Die in den folgenden Tabellen angeführten Zahlen beziehen sich auf die eben dargelegten verschiedenen Modifikationen der Methode.

Folgende Untersuchungsreihen wurden durchgeführt:

1. S. p o o n a , Stamm Nr. 91 (13, 22), homologes Serum T 74.

Ergebnisse siehe Tabelle 7.

Serum T 74 (13, 22)											
	1600	3200	6400	12800	25600	51200	102400	204800	409600	819200	NaCl
(1)	2	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-
(2)	3	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-
(3)	3	3	3	2	-	-	-	-	-	-	-
(4)	4	3	3	3	1	-	-	-	-	-	-
(5)	4	4	3	3	2	-	-	-	-	-	-
(6)	4	4	4	4	4	4	4	4	3	-	-

Tab. 7 Kontrolle der verschiedenen Modifikationen mit S. poona, Stamm Nr. 91 (13, 22).

Wie aus Tabelle 7 hervorgeht, resultierte von Modifikation (1) bis Modifikation (6) ein durchgehender graduel- und absoluter Anstieg im Ausfall der Hämagglutinationsreaktion. Modifikation (6) erwies sich auch bei diesem Stamm als optimale Methode. Der Serumtiter wurde mit 1 : 25 600 ermittelt und lag damit um sechs Stufen höher, als der mit der Ausgangsmethode erhaltene Titer.

2. S. h v i t t i n g f o s s , Stamm Nr. 95 (16), homologes Serum T 75.

Die Versuchsergebnisse sind in Tabelle 8 enthalten.

Serum T 75 (16)											
	50	100	200	400	800	1600	3200	6400	12	25	NaCl
(1)	4	4	4	4	3	3	1	1	-	-	-
(2)	3	3	3	3	2	2	1	-	-	-	-
(3)	4	4	4	4	4	4	4	1	-	-	-
(4)	4	4	4	4	4	4	4	3	2	-	-
(5)	4	4	4	4	4	4	4	4	1	-	-
(6)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3	-

Tab. 8 Kontrolle mit S. hvittingfoss, Stamm Nr. 95 (16)

Die Modifikation (6) erwies sich wiederum als optimale Methode, wobei eine Titersteigerung um zwei Verdünnungsstufen erreicht wurde. Die weiteren Ergebnisse dieser Versuchsreihe stimmten im Prinzip ebenfalls mit denen der vorhergehenden Kontrolluntersuchung überein.

3. S. k i r k e e , Stamm Nr. 97 (17), homologes Serum T 76.

Versuchsergebnisse siehe Tabelle 9.

Serum T 76 (17)											
	50	100	200	400	800	1600	3200	6400	12	25	NaCl
(1)	4	4	3	3	2	-	-	-	-	-	-
(2)	3	3	3	2	1	-	-	-	-	-	-
(3)	4	4	4	4	4	3	2	-	-	-	-
(4)	4	4	4	4	4	3	3	-	-	-	-
(5)	4	4	4	4	4	4	3	1	-	-	-
(6)	4	4	4	4	4	4	3	2	1	-	-

Tab. 9 Kontrolle der verschiedenen Modifikationen mit S. kirkee, Stamm Nr. 97 (17).

Tab. 9 veranschaulicht deutlich die Empfindlichkeitszunahme Reaktion. Mit der Modifikation (6) sind auch hier wieder optimale Verhältnisse für den Reaktionsablauf erreicht. Es war eine Steigerung gegenüber der Ausgangsmethode um vier Titerstufen möglich.

4. S. p a r a t y p h i C, "East Africa", Stamm Nr. 32

(Vi, 6, 7) und den Seren:

a) Typhus - Vi, R. Koch-Institut, Nr. 1282

b) Ballerup - Vi, R. Koch-Institut, Nr. 151.

Versuchsergebnisse siehe Tabelle 10.

Bei den Untersuchungen mit dem Typhus-Vi-Serum zeigte sich eine positive Reaktion erst bei der Modifikation (3). Bis zur Modifikation (6) der Methode trat dann eine Empfindlichkeitssteigerung um zwei Verdünnungsstufen ein.

Serum Typhus-V-1282										
	50	100	200	400	800	1600	3200	6400	12800	25600
	NaCl	600	800	1200	1600	2000	2400	2800	3200	3600
(1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(3)	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-
(4)	4	4	3	3	-	-	-	-	-	-
(5)	4	4	3	2	-	-	-	-	-	-
(6)	4	4	4	3	-	-	-	-	-	-

Tab. 10 Kontrolle der verschiedenen Modifikationen mit S. paratyphi C, Stamm Nr. 32 (Vi, 6, 7) und Typhus-Vi-Serum.

Mit dem Ballerup-Vi-Serum ließ sich in keiner Testreihe eine Hämagglutinationsreaktion erzielen. Dies veranlasste zu der Annahme, daß das Vi-Antigen infolge der vierwöchigen Lagerung der Antigenlösungen nicht mehr in aktiver Form vorlag. Die Kontrolluntersuchungen mit Ballerup-Vi-Serum und auch mit Typhus-Vi-Serum wurden deshalb mit frischgewonnenen Antigenlösungen wiederholt. Dabei ergab sich je-

doch keine wesentliche Änderung der zuvor erhaltenen Resultate. Die niedrigen Titer beim Serum Typhus-Vi und das Fehlen eines Titers beim Serum Ballerup-Vi müssen deshalb mit einer schlechten Ausbildung von Vi-Antikörpern in den betreffenden Seren erklärt werden. Dies stimmt mit der Erfahrung überein, daß hochwertige Vi-Seren allgemein nur unter großen Schwierigkeiten erhalten werden.

5. S h i g . F l e x n e r i , Flexner-Polyvalentserum, R. Koch-Institut, Nr. 1378.

Die Versuchsergebnisse sind in Tabelle 11 aufgeführt.

Wiederum brachte die Modifikation (6) der Hämagglutinationsmethode den höchsten Serumtiter, wobei die Agglutination bis zum vorletzten positiven Röhrchen maximal war. Die Titersteigerung betrug von Modifikation (1) bis Modifikation (6) insgesamt drei Stufen.

6. B. a b o r t u s , homologes Patientenserum des Tübinger Hygiene-Instituts.

In dieser Untersuchungsreihe waren keinerlei positive Reaktionen nachweisbar.

Serum Polyval. Nr. 1378											
	50	100	200	400	800	1600	3200	6400	12800	25600	NaCl
(1)	4	4	3	2	-	-	-	-	-	-	-
(2)	4	3	2	-	-	-	-	-	-	-	-
(3)	4	4	4	3	3	-	-	-	-	-	-
(4)	4	4	4	4	4	3	1	-	-	-	-
(5)	4	4	4	4	4	3	1	-	-	-	-
(6)	4	4	4	4	4	4	2	-	-	-	-

Tab. 11 Kontrolle der verschiedenen Modifikationen mit Shig. Flexneri.

Um zu klären auf welcher Stufe die Hemmung des Reaktionsablaufes erfolgt war, d.h. ob die Anlagerung des Antigens an die Erythrozyten ausgeblieben war oder ob diese und die anschließende Antigen-Antikörper-Reaktion zwar stattgefunden hatte, der Agglutinationsvorgang infolge Vorliegens inkompletter Antikörper jedoch ausgeblieben war, wurde folgender Nebenversuch angestellt:

Zu dem fertigen Reaktionsgemisch wurde Antigammaglobulinserum gegeben, das auf Grund des Gammaglobulincharakters der Antikörper, bei Vorhandensein von Erythrozyten-Antigen-Antikörper-Komplexen, diese Komplexe zur Agglutination bringen würde. Entsprechend der Herkunft des agglutinierenden Serums fand dabei Anti-Menschengammaglobulinserum an Stelle von Kaninchenserum Verwendung. Da auch unter diesen Bedingungen keine Hämagglutination zu erzielen war, konnte angenommen werden, daß die Antigene dieses Stammes nicht an Erythrozyten adsorbierbar sind. Es besteht allerdings auch noch die Möglichkeit, daß die Antigene bei der Sensibilisierung zu tief in die Erythrozytenoberfläche einsinken, sodaß die Antikörper nicht mit den derart maskierten Antigenen reagieren können, worauf N e t e r , C o h e n , W e s t p h a l , L ü d e r i t z , H a r t (1957) und N e t e r , C o h e n , W e s t p h a l , L ü d e r i t z (1957) in anderem Zusammenhang hinwiesen.

7. Nochmalige Kontrolluntersuchung mit S. n e w i n g - t o n , Stamm Nr. 84 (3, 15) und homologem Serum T 73.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 12 wiedergegeben.

Serum T 73 (3, 15)											
	12 25 50 100 200 400 800 1600 3200 6400 800 600 NaCl										
(1)	4	4	3	3	2	2	-	-	-	-	-
(2)	4	4	3	2	-	-	-	-	-	-	-
(3)	4	4	4	4	3	3	2	-	-	-	-
(4)	4	4	4	4	4	3	3	-	-	-	-
(5)	4	4	4	4	4	3	3	-	-	-	-
(6)	4	4	4	4	4	4	4	3	-	-	-

Tab. 12 Kontrolluntersuchung mit S.newington, Stamm Nr.84(3,15)

Es zeigte sich, daß die Reaktionsergebnisse der einzelnen Modifikationen weitgehend mit den früher ermittelten Werten übereinstimmten. Die Modifikation (6) wurde wiederum als optimale Methode bestätigt, bei einer Empfindlichkeitssteigerung von zwei Verdünnungsstufen gegenüber der Ausgangsmethode.

Nach Abschluss der Kontrolluntersuchungen ließ sich grundsätzlich feststellen, daß die bei den vorausgegangenen Untersuchungen mit S. newington als optimal ermittelte Modifikation, sich auch bei den jetzt untersuchten Stämmen als die Methode der Wahl erwiesen hat. (Mit Ausnahme von B. abortus). Wie im einzelnen schon geschildert, waren - verglichen mit der Ausgangsmethode - Titererhöhungen um zwei bis sechs Verdünnungsstufen zu verzeichnen. Im Verlauf der Untersuchungen trat mit zunehmender Verbesserung der Methodik immer häufiger eine bis zu den letzten positiven Röhrchen gleichbleibende, massive Hämagglutination auf. Es trat also kein langsames Absinken des Reaktionsausfalles ein, der Übergang zum negativen Wert erfolgte vielmehr meist unvermittelt aus maximaler oder nahezu maximaler Agglutination heraus. Da aus diesem Grunde keine nennenswerte Differenzierung zwischen den einzelnen Reaktionsstufen erforderlich ist, genügen für die Ablesung der indirekten Hämagglutination drei Wertungsstufen für den positiven Reaktionsausfall.

Im einzelnen ergibt sich dann folgendes Bewertungsschema:

- 3 + : bei zusammenhängendem Erythrozytenhäutchen, das bei Antippen des Röhrchens als Ganzes in die Schwebelbe geht;
- 2 + : bei grobflockigem Agglutinat;
- 1 + : bei feinkörnigem Agglutinat.

Bei Benutzung dieses Ablesungsmodus ist gleichzeitig die Übereinstimmung mit der Auswertung der Gruber-Reaktion gegeben und damit der Vergleich erleichtert.

D. Vergleichende Agglutinationsergebnisse.

Parallel zu diesen Hämagglutinationsversuchen laufend, wurden für sämtliche benutzten Stämme die jeweiligen Reaktionsausfälle mittels der Agglutinations-Reaktion bestimmt. Dazu wurden Lebendantigene benutzt.

Die Versuchsergebnisse sind aus Tabelle 13 zu entnehmen.

Es ging daraus folgendes hervor:

- 1) Die Titer der Agglutinations-Reaktion liegen bei denjenigen Bakterienstämmen, die eine einwandfreie Häm-agglutinationsreaktion aufweisen, um durchschnittlich vier bis fünf Stufen unter denen der indirekten Hämagglutination.
- 2) Die Reaktion mit *B. abortus* ist stark, während die Vi-Stämme auch hier kaum reagieren.

	Seren, homologe										
	50	100	200	400	800	1600	3200	6400	800	600	NaCl
S.newington	3	3	3	2	1	-	-	-	-	-	-
S.poona	3	3	3	3	2	2	2	1	1	-	-
S.hvittingfoes	3	3	3	3	2	2	-	-	-	-	-
S.kirkee	3	3	3	3	1	-	-	-	-	-	-
S.paratyphi C (Typhus-Vi-S.)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S.paratyphi C (Baller.-Vi-S.)	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Shig.Flexneri	3	3	3	2	2	2	1	1	-	-	-
B.abortus	3	3	3	3	3	3	-	-	-	-	-

Tab. 13 Vergleichende Untersuchungen der benutzten Bakterienstämme mit der Agglutinations-Reaktion. Maximale Agglutination jeweils mit 3+ ausgedrückt.

III, B e s p r e c h u n g d e r E r g e b n i s s e .

Die beschriebenen Versuche haben gezeigt, daß sich durch zweckmäßiges Variieren der gegebenen Versuchsbedingungen eine optimale Empfindlichkeit der indirekten Hämagglutination erzielen ließ. Dabei ist von besonderer Wichtigkeit, daß die erhaltenen Werte stets mit nur ganz geringer Streuung reproduzierbar waren. Diese Feststellung gilt zumindest für die untersuchten Salmonellenarten ohne Einschränkung.

Für diese Erregergruppe dürfte vorliegende Methode als genügend standardisiert anzusehen sein, um als empfindliche, praktische und verlässliche Untersuchungsmethode Anwendung zu finden.

Sie ist in gleicher Weise geeignet, als Widal-Reaktion zur Analyse unbekannter Antikörper und als Gruber-Reaktion zur Analyse von Antigenen in qualitativer und quantitativer Hinsicht eingesetzt zu werden.

Die Vorteile gegenüber den klassischen Gruber- und Widal-Reaktionen liegen dabei auf der Hand. Es sind dies die höhere Empfindlichkeit, die größere Exaktheit der Titrierfestlegung und das raschere Vorliegen der Ergebnisse, die in ca. zweieinhalb Stunden zu erhalten sind.

Das von uns angegebene Verfahren der indirekten Hämagglutination darf deshalb als ein Schritt in Richtung Standardisierung und Vereinfachung der Reaktion angesehen werden.

IV. Z u s a m m e n f a s s u n g .

Mit einem Salmonella-Stamm, *S. newington*, wurde eine Methode der indirekten Hämagglutination entwickelt, die sich durch optimale und reproduzierbare Ergebnisse auszeichnete.

Die ausgearbeitete Methode verbindet optimale Ergebnisse mit geringem Zeitaufwand.

Die Erprobung dieser Methode an fünf anderen Bakterienstämmen, *S. poona*, *S. hvittingfoss*, *S. kirkee*, *S. paratyphi C* - "East Africa" und *Sh. flexneri*, ergab ihre Brauchbarkeit auch für andere Angehörige der Enterobacteriaceae. Eine indirekte Hämagglutination mit Brucella-Antigen erwies sich als nicht durchführbar.

V. L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s .

1. Adler, F. L.: On hemolysis mediated by non-erythrocytic antigens, their homologous antibodies and complement. Proc.Soc.exp.Biol.Med., 74, 561 (1950)
2. Alexander, M. M., Wright, G. G. and Baldwin, A.C.: Observations on the agglutination of polysaccharide-treated erythrocytes by tularemia antisera. J.exp. Med., 91, 561 (1950)
3. Bader, R.-E.: Über die Herstellung eines agglutinierenden Serums gegen die Rundform von Shigella sonnei mit einem Stamm der Gattung Pseudomonas. Z.Hyg., 140, 450 (1954)
4. Boyden, S.V.: The adsorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein sera. J.exp.Med., 93, 107 (1951)
5. Boyden, S.V.;and Suter, W.E.: Stimulating effect of tuberculin upon production of circulating antibodies in guinea pigs infected with tubercle bacilli. J.Immunol. 68, 577 (1952)
6. Boyden, S.V.: Fixation of bacterial products by erythrocytes in vivo and by leucocytes. Nature 171, 402 (1953)
7. Brodhage, H. and Fey, H.: Beobachtungen bei der Hämagglutinationsreaktion auf Bang und Tuberkulose mit menschlichen und tierischen Sera. Z.Hyg.u.Inf.Krkh., 141, 76, (1955)
8. Chen, T.H.: Studies on immunization against plague. IV. The method of the hemagglutination test and some observations on the antigen. J.Immunol., 69, 587 (1952)
9. Cohen, E., Nisonoff, A., Hermes, P., Noveross, B.M. and Lockie, L.M.: Agglutination of sensitized alligator erythrocytes by rheumatoid factor (s). Nature 190, 552 (1961)

10. Cole, L.R. and Farrel, V.R.: A method for coupling protein antigens to erythrocytes. *J.exp.Med.*, 102, 631 (1955)
11. De Gregorio, M.: Fissazione di antigeni sulla superficie cellulare. *Boll.ist.sieroterap.milan.*, 34, 118 (1955)
12. Freeman, G.G.: The preparation and properties of a specific polysaccharide from *Bact. typhosum* Ty₂. *Biochem. J.*, 36, 340 (1942)
13. Feinberg, R.J. and Wright, G.G.: Hemagglutination by tularemia antisera and its inhibition by polysaccharide. *Federation Proc.*, 10, 407 (1951)
14. Fisher, S.: The haemagglutinin of *Haemophilus pertussis*. *Austr.J.exp.Biol.Med.Science*, 28, 509 (1950)
15. Fisher, S. and Keogh, E.V.: Lysis by complement of erythrocytes which have adsorbed a bacterial component and its antibody. *Nature* 165, 248 (1950)
16. Fulthorpe, A.J.: Agglutination of shepp erythrocytes sensitized with *Salmonella* polysaccharides. *J.Path. and Bact.*, 68, 315 (1954)
17. Hallmann, L.: *Bakteriologie und Serologie*, Thieme-Verlag Stuttgart, 616 (1961)
18. Hansen, K.: *Allergie*, Thieme-Verlag Stuttgart, 55 (1957)
19. Hayes, L. and Stanley, N.F.: The preparation and properties of somatic antigens isolated from *Bacterium coli*. *Austr.J.exp.Biol.Med.Science*, 28, 201 (1950)
20. Hayes, L. and Stanley, N.F.: Specific serum agglutination of sheep erythrocytes sensitized with bacterial polysaccharides. Wie bei 19. 29, 51 (1951)
21. Hirst, G.K.: The agglutination of red cells by allantoic fluid of chick embryos infected with influenza virus. *Science*, 94, 22 (1941)
22. Kauffmann, F., Lüderitz, O., Stierlin, H. und Westphal, O.: Zur Immunochemie der O-Antigene von Enterobacteriaceae: I. Analyse der Zuckerbausteine von *Salmonella*-O-Antigenen. *Zbl.Bakt.I, Orig.*, 178, 442 (1960)

23. Kauffmann, F., Braun, O.H., Lüderitz, O., Stierlin, H. und Westphal, O.: Zur Immunochemie der O-Antigene von Enterobacteriaceae: IV. Analyse der Zuckerbausteine von Escherichia-O-Antigenen. Zbl.Bakt.I.Orig., 180, 180 (1960)
24. Kauffmann, F., Jann, B., Krüger, L., Lüderitz, O. und Westphal, O.: Zur Immunochemie der O-Antigene der Enterobacteriaceae: VIII. Analyse der Zuckerbausteine von Polysacchariden weiterer Salmonella- und Arizona-O-Gruppen. Zbl.Bakt.I.Orig., 186, 509 (1962)
25. Keogh, E.V., North, E.A. and Warburton, M.F.: Haemagglutinins of the Haemophilus group. Nature 160, 63 (1947)
26. Keogh, E.V., North, E.A. and Warburton, M.F.: Adsorption of bacterial polysaccharides to erythrocytes. Wie bei 25. 161, 687 (1948)
27. Kirby, W.M.M.: Hemagglutination reaction in streptococcal infections and acute rheumatic fever. Proc. Soc. exp.Biol.Med., 78, 519 (1951)
28. Landy, M. and Webster, M.E.: Studies on Vi antigen. III. Immunological properties of purified Vi antigen derived from Escherichia coli 5396/38. J.Immunol. 69, 143 (1952)
29. Landy, M. and Lamb, E.: Estimation of Vi antibody employing erythrocytes treated with purified Vi antigen. Proc.Soc.exp.Biol.Med., 82, 593 (1953)
30. Landy, M. and Lamb, E.: On hemagglutination procedures utilizing isolated polysaccharide and protein antigens. Am.J.Publ.Health, 44, 2, 1059 (1954)
31. Landy, M., Trapani, R.J. and Clark, W.R.: Studies on the O Antigen of Salmonella typhosa: Am.J.Hyg., 62, 54 (1955)
32. Le Minor, S., Le Minor, S., et Grabar, J.: Réaction d'hémagglutination passive et d'hémolyse directe au moyen de globules rouges sensibilisés par des substances solubles O et Vi d'entérobactériacées. Ann.Inst.Past., 83, 62 (1952)

33. Mc Kenna, J.M.; A stable preparation of antigen-sensitized erythrocytes. *Proc.Soc.exp.Biol.Med.*, 95, 591 (1957)
34. Middlebrook, G., and Dubos, R.J.: Specific serum agglutination of erythrocytes sensitized with extracts of tubercle bacilli. *J.exp.Med.*, 88, 521 (1948)
35. Miescher, P. und Vorlaender, K.O.: *Immunpathologie in Klinik und Forschung*, 2. Aufl., Thieme-Verlag Stuttgart, 42 (1961)
36. Neter, E., Bertram, L.F., Zak, D.A., Murdock, M.R. and Arbesmann, C.E.: Studies on hemagglutination and hemolysis by *Escherichia coli* antisera. *J.exp.Med.*, 96, 1, (1952)
37. Neter, E., Bertram, L.F. and Arbesmann, C.E.: Demonstration of *Escherichia coli* 055 and 0111 antigens by means of hemagglutination test. *Proc.Soc.exp.Biol.Med.*, 79, 255 (1952)
38. Neter, E. and Zalewski, N.J.: The requirement of electrolytes for the adsorption of *Escherichia coli* antigen by red blood cells. *J.Bact.*, 66, 424 (1953)
39. Neter, E., Gorzynski, E.A., Zalewski, N.J.; Rachman, R. and Gino, R.M.: Studies on bacterial hemagglutination. *Am.J.Publ.Health*, 44, 1, 49 (1954)
40. Neter, E. and Walker, J.: Hemagglutination test for specific antibodies in dysentery caused by *Shigella sonnei*. *Am.J.clin.Path.*, 24, 1424 (1954)
41. Neter, E. and Gorzynski, E.A.: Erythrocyte-modifying capacity of *Shigella dysenteriae* (Shiga) antigen and its polysaccharide component. *Proc.Soc.exp.Biol.Med.*, 85, 503 (1954)
42. Neter, E.: Bacterial hemagglutination and hemolysis. *Bact.Reviews*, 20, 166 (1956)
43. Neter, E., Westphal, O., Lüderitz, O., Gorzynski, E.A. and Eichenberger, E.: Studies of enterobacterial lipopolysaccharides: Effects of heat and chemicals on erythrocyte-modifying, antigenic, toxic, and pyrogenic properties. *J.Immunol.*, 76, 377 (1956)

44. Neter, E., Cohen, E., Westphal, O., Lüderitz, O. and Hart, E.P.: Effect of trypsin on agglutinability of lipopolysaccharide treated erythrocytes. *Proc.Soc.exp.Biol. Med.*, 96, 803 (1957)
45. Neter, E., Cohen, E., Westphal, O., Lüderitz, O.: The effects of proteolytic enzymes on agglutination by bacterial antibodies of lipopolysaccharide modified erythrocytes. *J.Immunol.*, 82, 85 (1957)
46. Neter, E. and Gorzynski, E.A.: Studies on indirect staphylococcal hemagglutination. *Z.Immun.Forsch.*, 118, 269 (1959)
47. Norden, A.: Agglutination of sheep's erythrocytes sensitized with histoplasmin. *Proc.Soc.exp.Biol.Med.*, 70, 218 (1949)
48. Oeding, P.: Immunochemical studies of staphylococcal polysaccharides. *Acta path.microb.Scand.*, 37, 116 (1955)
49. Oeding, P.: Observations on the sensitization of erythrocytes with staphylococcal polysaccharide products. *Acta path.microb.Scand.*, 41, 435 (1957)
50. Popp, L.: Über die Hämagglutinations-Hämolyse-Reaktion in der Diagnostik der Tuberkulose. *Klin.Wschr.*, 30, 773 (1952)
51. Roemer, G.B. and Mai, K.Z.: Antikörpernachweis bei Enterokokken-Infektionen des Menschen durch indirekte Hämagglutination. *Z.Hyg.*, 147, 109 (1960)
52. Sachse, H.H.: Zur Frage der Spezifität von Hämagglutinationsreaktionen vom Typ Middlebrook-Dubos. *Beitr. Klin. Tub.*, 121, 148 (1959)
53. Schiff, W. und Seidlitz, E.: Über einen Hämagglutinationstest auf Tuberkulose (Middlebrook-Dubos) mit papainisierten Blutkörperchen. *Z.Immun.Forsch.*, 111, 69 (1954)
54. Scott, N.B. and Smith, D.T.: A simple modification of the Middlebrook and Dubos hemagglutination test for serum antibodies to products of tubercle bacilli. *J.Labor. and clin.Med.*, 35, 303 (1950)

55. Sieburth, J.Mc.N.: Indirect hemagglutination studies on salmonellosis of chickens. *J.Immunol.*, 78, 380 (1957)
56. Sieburth, J.Mc.N.: The indirect hemagglutination test in the avian *Salmonella* problem. *Am.J.Vet.Res.*, 19, 729 (1958)
57. Sieburth, J.Mc.N.: Stable, standardized, sensitized chicken erythrocytes for the polyvalent *Salmonelle* indirect hemagglutination test. *Am.J.Vet.Res.*, 21, 1084 (1961)
58. Sohler, R., Trimberger, I. et Juillard, J.: Réaction d'hémagglutination type Middlebrook-Dubos réalisée avec les sématis humaines O et la nouvelle tuberculine I.P.48. *Ann.Inst.Past.*, 79, 347 (1950)
59. Spaun, J.: On the determination of the Vi-antibodies by hemagglutination. *Acta path.microb.Scand.*, 29, 416 (1951)
60. Spaun, J.: Determination of *Salmonella typhi* O and Vi antibodies by hemagglutination. *Acta path.microb.Scand.* 31, 462 (1952)
61. Staub, A.M.: Role des anticorps antipolysidiques dans l'agglutination des bacilles typhiques. *Ann.Inst.Past.* 86, 618 (1954)
62. Takahashi, Y., Fujita, S. and Sasaki, A.: The specificity of the passive hemagglutination methods used in serology of tuberculosis. *J.exp.Med.*, 113, 2, 1141 (1961)
63. Thomas, J.C. and Mennie, A.T.: Bacterial polysaccharides in the diagnosis of infections. The polysaccharide lysis test. *Lancet*, 2, 745 (1950)
64. Webster, M.E., LandyM, and Freeman, M.E. : Studies on Vi-antigen. II. Purification of Vi antigen from *Escherichia coli* 5396/38. *J.Immunol.*, 69, 135 (1952)
65. Weinbach, R.: Die Verwendbarkeit formolbehandelter Erythrozyten als Antigenträger in der indirekten Hämagglutination. *Schweizer Z.Path.*, 22, 1 (1959)

66. Weinbach, R.: Über ein merwürdiges Verhalten von Kaninchen-Sh.-sonnei R-Immunsera in der indirekten Hämagglutination. Z.Immun.Fschg., 117, 244 (1959)
67. Westphal, O., Kauffmann, F., Lüderitz, O. und Stierlin, H.: Zur Immunochemie der O-Antigene von Enterobacteriaceae. III. Analyse der Zuckerbausteine kreuzreagierender Salmonella-, Arizona- und Escherichia-O-Antigene. Zbl. Bakt.I.Orig., 179, 336 (1960)
68. Woerner, H.: Wirkungen des Tannins auf immunologische Vorgänge. Zbl.Bakt.I.Orig., 166, 100 (1956)
69. Wright, G.G. and Feinberg, R.J.: Hemagglutination by tularemia antisera. J.Immunol., 68, 65 (1952)

Meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. med.
Richard-Ernst B a d e r , danke ich sehr herzlich für
die Überlassung des Dissertationsthemas.

Meinen ganz besonderen Dank möchte ich an dieser
Stelle für die hervorragenden Arbeitsbedingungen aus-
sprechen, die ich in seinem Institut vorfand und für
seine immerwährende Bereitschaft, bei allen im Verlau-
fe der Arbeit auftauchenden Fragen und Problemen zu be-
raten und zu helfen.

L e b e n s l a u f

Am 28. Juni 1938 wurde ich, Günther K i e n i n g e r , als Sohn des Mühlenbesitzers Eugen Kieninger und seiner Ehefrau Elisabeth, geb. Birkner, in Ballmertshofen, Kreis Heidenheim/Brenz, geboren.

Von 1944 bis 1948 besuchte ich die Volksschule in Ballmertshofen und anschließend das Humanistische Gymnasium in Günzburg/Donau, wo ich im Sommer 1957 das Abitur bestand.

Im Wintersemester 1957/58 begann ich an der Universität Tübingen mit dem Studium der Medizin, bestand 1958 das Vorphysikum, studierte im fünften und sechsten Semester an der Universität Hamburg, wo ich im Herbst 1960 das Physikum ablegte. Das erste klinische Semester verbrachte ich in München, vom Sommersemester 1961 an studierte ich wieder an der Universität Tübingen, wo ich im Dezember 1963 das medizinische Staatsexamen abschloss.

